

Strukturgebende Signale im eukaryontischen Genom – Vorhersage und Verifizierung

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Martin Klar
aus Braunschweig

1. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Bode
2. Referent:	Prof. Dr. Ralf Rainer Mendel
eingereicht am:	27.01.05
mündliche Prüfung (Disputation) am:	22.04.05
 Druckjahr:	 2005

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag:

KLAR M., STELLAMANN E., AK P., BODE J. (2004). Beyond the Identification of Transcribed Sequences: Functional, Expression and Evolutionary Analysis; 10th anniversary of Kazusa DNA Research Institute; BITS2004, 14th International Workshop, Kazusa Akademia Hall, Kisarazu, Chiba, Japan.

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation_____	I
Inhaltsverzeichnis_____	II
Zusammenfassung	1
1. Einleitung _____	2
1.1 <i>Stress-Induced Duplex Destabilization</i> – Das SIDD-Profil _____	2
1.2 Die Bedeutung von DNase I-hypersensitiven Stellen im Chromatin _____	4
1.3 Das Interferon-β Gen _____	5
1.3.1 Interferone und ihre biologische Funktion_____	5
1.3.2 Transkriptionelle Aktivierung des humanen Interferon-β Gens (IFNB1)____	5
1.4 Aufgabenstellung _____	9
2. Ergebnisse _____	10
2.1 Nachweis von spezifischen Protein-DNA Interaktionen im Kontrollbereich der IFNB1-Domäne _____	10
2.1.1 Identifizierung spezifischer Protein-DNA Komplexe innerhalb der destabilisierten Region HS2_____	11
2.1.2 Identifizierung spezifischer Protein-DNA Komplexe innerhalb der destabilisierten Regionen HS1 und HS3_____	14
2.2 Analogien zwischen der humanen und murinen IFNB1-Domäne _____	21
2.3 Einfluss des genomischen Kontrollbereiches auf die Regulation des humanen IFN-β Promotors _____	23
2.4 Identifizierung der spezifischen DNA-bindenden Proteine _____	28
2.4.1 Identifizierung der sE7-assoziierten Faktoren_____	28
2.4.2 Identifizierung der HS1- und HS3-assoziierten Faktoren_____	34
2.5 Verifizierung von regulatorischen Eigenschaften der identifizierten Proteine YY1 und YY2 auf den humanen IFN-β Promotor _____	37
2.5.1 Einfluss transienter YY1 und YY2 Expression auf stabil integrierte Reportergenkonstrukte des Kontrollbereichs der humanen IFNB1-Domäne____	37
2.5.2 Verifizierung weiterer potentieller YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen innerhalb des untersuchten Kontrollbereichs_____	39
2.5.3 <i>In vivo</i> Beteiligung von Yin Yang-Proteinen an der Regulation der humanen IFN-β Produktion_____	42
3. Diskussion & Ausblick _____	45
3.1 Korrelation von SIDD-Minima und spezifischen Transkriptionsfaktor DNA-Bindungsstellen _____	45

3.1.1	Nachweis der DNA-Doppelstrang-bindenden Faktoren YY1 und YY2	46
3.1.2	Das humane YY1-homologe Protein YY2	51
3.1.3	Nachweis der DNA-Einzelstrang-bindenden Faktoren der PUR-Proteinfamilie	52
3.1.4	Nachweis des POU-Domänen Transkriptionsfaktors Oct-1	55
3.2	Beteiligung der identifizierten Proteine YY1 und YY2 an der Regulation des humanen IFN-β Promotors	56
3.3	Vergleichende Analyse der SIDD-Profile von Mensch und Maus	61
3.4	Ausblick	62
4.	Material & Methoden	64
4.1	Geräte	64
4.2	Materialien	65
4.2.1	Chemikalien	65
4.2.2	Enzyme	65
4.2.3	Translationssysteme	65
4.2.4	Zellkulturmaterialien	65
4.2.5	Filterpapiere und Transferfolien	65
4.2.6	Computerprogramme	65
4.2.7	Plasmide	65
4.2.8	Oligonukleotide	67
4.2.9	Antikörper	70
4.3	Allgemeine Grundtechniken	70
4.3.1	Sterilisation	70
4.3.2	Fällung von Nukleinsäuren	71
4.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	71
4.3.3.1	... durch Fluorometrie	71
4.3.3.2	... durch Photometrie	71
4.3.3.3	... durch Elektrophorese	71
4.4	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	72
4.4.1	Verwendete <i>E. coli</i> – Stämme	72
4.4.2	Kultivierung von Bakterien	72
4.4.3	Herstellung kompetenter Bakterien	72
4.4.4	Transformation von <i>E. coli</i>	73
4.4.4.1	Elektrotransformation	73
4.4.4.2	Chemische Transformation	73
4.4.5	Anlage von Glycerinkulturen	73
4.5	Isolierung von Nukleinsäuren	73
4.5.1	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab: <i>Boiling Prep</i>	73
4.5.2	Präparative Plasmidisolierung mittels QIAGEN Maxi Kits	74

4.5.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen via „ <i>QIAquick</i> “ Gel <i>Extraction Kit</i>	75
4.5.4	Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen: <i>Quick-HMW-DNA</i>	75
4.5.5	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	76
4.6	Modifikation von Nukleinsäuren	77
4.6.1	Restriktionsanalyse von DNA	77
4.6.2	Dephosphorylierung	77
4.6.3	T4-Kinase-Reaktion	78
4.6.4	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden	78
4.6.5	Ligation von DNA-Fragmenten	78
4.7	<i>Polymerase chain reaction (PCR)</i>	79
4.7.1	DNA-Amplifikation durch PCR	79
4.7.2	Ortsgerichtete Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i> , SDM)	80
4.7.3	Sequenzierung von DNA	80
4.8	Gelelektrophoresen	81
4.8.1	Agarose-Gelelektrophorese	81
4.8.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	82
	4.8.2.1 denaturierende SDS-PAGE	82
	4.8.2.2 native PAGE	83
4.8.3	Trocknung von Polyacryamidgelen	83
4.9	Radioaktive Nachweismethoden	83
4.9.1	DNA-Markierung mit dem „ <i>Rediprime DNA Labelling System</i> “	83
4.9.2	<i>Southern Blotting</i>	83
4.9.3	<i>Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)</i>	85
4.10	Arbeiten mit eukaryontischen Zellsystemen	87
4.10.1	Arbeiten mit Hefen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) – <i>Yeast One-Hybrid System</i>	87
	4.10.1.1 Lösungen und Medien	87
	4.10.1.2 Verwendete Hefe-Stämme	88
	4.10.1.3 Kultivierung von Hefen	88
	4.10.1.4 Transformation von Hefen	89
	4.10.1.5 Selektion und Reporter-Test (<i>lift filter assay</i>)	89
4.10.2	Arbeiten mit Säugerzellen	90
	4.10.2.1 Zelllinien	90
	4.10.2.2 Medien und Lösungen	90
	4.10.2.3 Kultivierung von Zelllinien	91
	4.10.2.4 Passagierung	91
	4.10.2.5 Langzeitlagerung von Zellen	91
	4.10.2.6 Transfektion von Säugerzellen	92

4.10.2.6.1 Transfektion von Säugerzellen mittels Lipofektion_____	92
4.10.2.6.2 Transfektion von Säugerzellen mittels Elektroporation_____	92
4.10.2.7 Durchführung einer Selektion_____	93
4.10.2.8 Virusinduktion_____	93
4.10.2.8.1 Virusinduktion stabiler Klongemische_____	93
4.10.2.8.2 Virusinduktion nach transienter Expression_____	93
4.10.2.8.3 Interferon Test_____	94
4.10.2.9 <i>In vitro</i> - Translation mit Reticulocyten-Lysat aus Kaninchen__	94
4.11 Proteinanalytik_____	95
4.11.1 Präparation von Zellkernextrakten_____	95
4.11.1.1 <i>Small-scale</i> Protokoll_____	95
4.11.1.2 <i>Large-scale</i> Protokoll_____	95
4.11.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten_____	96
4.11.3 Dialyse_____	96
4.11.4 Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Methode)_____	96
4.11.5 Bestimmung der Luciferaseaktivität_____	97
4.11.6 <i>Western Blotting</i> _____	97
4.11.7 DNA-Affinitätschromatographie_____	98
4.11.7.1 Heparinsäulenfraktionierung_____	98
4.11.7.2 Oligonukleotid-vermittelte DNA-Affinitätschromatographie__	99
5. Abkürzungen & Zeichen_____	100
6. Literaturverzeichnis_____	103

Zusammenfassung

Eukaryontische Genome sind in Chromatindomänen gegliedert. Es wird angenommen, dass derartige Strukturen unabhängige, regulatorische Einheiten darstellen. Typischerweise werden diese Domänen durch so genannte *scaffold/matrix attachment regions* (S/MARs) flankiert. Diese Regionen zeichnen sich durch Interaktionen von DNA-Elementen mit Proteinen der nukleären Matrix aus und dienen der Ausbildung von physikalischen Barrieren an den Rändern von Chromatindomänen. Frühere Studien konnten zeigen, dass S/MARs mit der biomathematischen Analyse des *stress-induced duplex destabilization* (SIDD)-Algorithmus, als größere Bereiche mit erhöhtem Strangtrennungspotential, vorhergesagt werden konnten. Des Weiteren wiesen SIDD-Kalkulationen in den meisten Fällen zusätzliche Regionen mit gesteigerter Tendenz zur Einzelstrangbildung (SIDD-Minima) auf, für die aber nur beschränkt S/MAR-Eigenschaften ermittelt werden konnten. Biochemische Untersuchungen solcher SIDD-Minima mittels DNase I deuteten jedoch auch auf eine regulatorische, Protein-vermittelte Funktion dieser DNA-Regionen hin. Diese Arbeit beschreibt daher die Etablierung einer effizienten Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von spezifischen DNA-Bindungsstellen und deren Interaktionspartnern innerhalb SIDD-Minima-assoziierter DNA-Sequenzen.

Am Beispiel einer entsprechenden Kontrollregion aus der humanen IFNB1 (IFN- β)-Domäne konnte für drei destabilisierte DNA-Bereiche, für die zuvor eine Korrelation mit DNase I-Hypersensitivität bestätigt wurde, mehrere spezifische Interaktionen mit DNA-bindenden Faktoren gezeigt werden. Interessanterweise sind die entsprechenden DNA-Elemente dabei -0.5, -2.0 bzw. -3.4 kb vom Transkriptionsstart entfernt. Anhand von *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)-Untersuchungen wurden DNA-Bindungsstellen für insgesamt sechs verschiedene Proteine identifiziert. Außer für die DNA-Doppelstrang-bindenden Faktoren YY1, YY2 und Oct-1 konnten zudem DNA-Bindungsplätze für die DNA-Einzelstrang-spezifischen Proteine PUR α und PUR β beschrieben werden.

Bei bisherigen *in vitro* und *in vivo* Studien bezüglich eines regulatorischen Einflusses der identifizierten DNA-Sequenzen auf den Virus-induzierbaren humanen IFN- β Promotor offenbarten insbesondere die DNA-Motive für die Faktoren der YY-Proteinfamilie eine entscheidende Rolle. Überexpressionsstudien der YY-Proteine bestätigten einen neuartigen Regulationsmechanismus dieser Faktoren an der Virusinduktion des IFN- β Promotors.

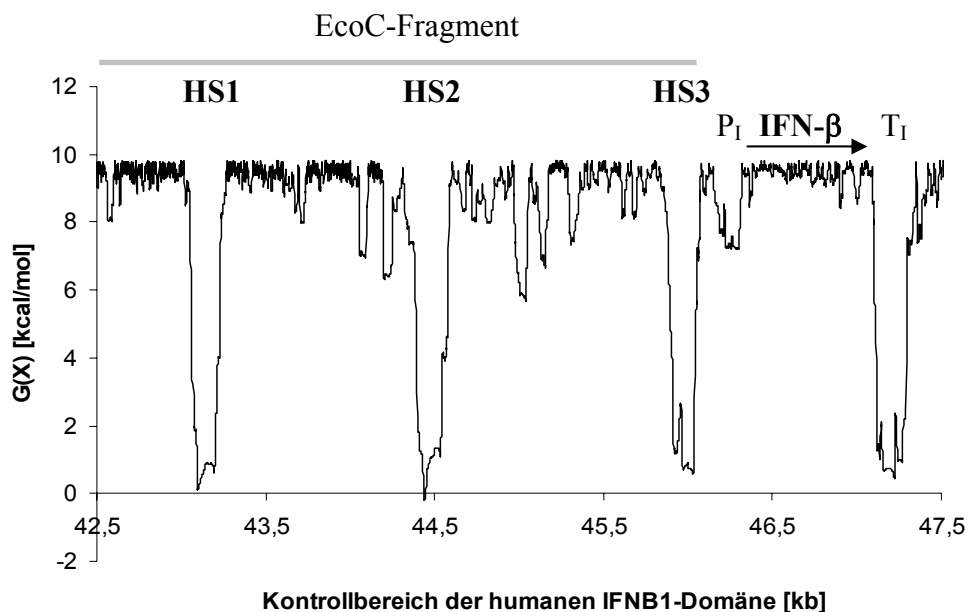
EMSA-Analysen am analogen DNA-Abschnitt der murinen IFN- β -Domäne zeigten vergleichbar positionierte DNA-Bindungsstellen für YY-Proteine.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse haben erstmals biochemisch bewiesen, dass der SIDD-Algorithmus das Potential besitzt regulatorische DNA-Bereiche, die nicht direkt Promotor-assoziert sind, vorherzusagen.

1. Einleitung

1.1 Stress-Induced Duplex Destabilization – Das SIDD-Profil

Die Verfügbarkeit vollständiger Nukleotidsequenzen verschiedener prokaryontischer und eukaryontischer Organismen regte entscheidend die Entwicklung und Anwendung Computer-gestützter Programme an, um die Organisation und Funktion von Genomen adäquat untersuchen zu können. Mitte der 90er Jahre wurde erstmals ein von C. Benham entwickeltes statistisches Analyseverfahren angewendet, welches der Berechnung der Stabilität der Doppelhelix-Bindung dient (Benham, 1996; Benham *et al.*, 1997). Das *stress-induced duplex destabilization profile* (SIDD-Profil) beschreibt die Stabilität der DNA-Doppelhelix und ermöglicht die Identifizierung jener Loci, die bei der Entstehung negativer, superhelikaler Spannung zur Strangtrennung neigen. Eine derartige Form der Superhelizität tritt bei der Interaktion mit bestimmten Proteinen, beispielsweise DNA- oder RNA-Polymerasen und/oder beim Verschwinden von Nukleosomen, auf. Die Kalkulation des Profils basiert dabei nicht nur auf den Bindungsenthalpien einzelner Basenpaare, sondern bezieht auch den Einfluss benachbarter DNA-Sequenzen mit in die Berechnung ein (Kompetitionsprinzip). Das Öffnen jeder einzelnen Basenpaarung resultiert in Veränderungen, die sich auf die Verteilung der superhelikalen Deformation (die Verwindung der DNA) auswirken, und somit das Denaturierungspotential aller Basenpaare innerhalb einer Domäne beeinflussen (Benham, 1996).



In der Grafik ist die freie Energie über der Sequenz aufgetragen. Je niedriger der Wert ist, desto leichter kann es in diesen Bereichen zur Ausbildung von DNA-Einzelsträngen kommen. Deutlich ist die Dreiteilung des IFN- β Gens zu erkennen: schwächere Destabilisierung des Promotorbereichs (P₁) im Vergleich zum Terminator (T₁), wohingegen die kodierende Region sehr stabil ist. Auffällig sind zudem drei dominant destabilisierte Bereiche *upstream* des IFN- β Promotors innerhalb des EcoC-Fragments (grauer Balken), hier mit HS1-HS3 bezeichnet.

Abbildung 1.1 zeigt das SIDD-Profil eines 5 kb großen Kontrollbereichs der humanen IFNB1-Domäne, bestehend aus einem *upstream* des IFNB1 Gens gelegenen Element (EcoC-Fragment; Mielke *et al.*, 1990) und dem IFNB1 Gen (IFN- β) selbst. Auffällig ist eine für funktionelle Gene typische Dreiteilung: Während der 3'-Terminatorbereich ein besonders starkes Strangtrennungspotential aufweist, ist der Promotor nur schwach destabilisiert. Die kodierende Region selbst zeigt keine Tendenz Einzelstränge auszubilden. Ähnliche Destabilisierungsprofile wie hier beim humanen IFNB1 Gen sind von C. Benham (1996) für verschiedene Gene der Hefe publiziert worden. Auch PolII-transkribierte rDNA Gene von Organismen wie *Drosophila melanogaster* oder der Maus zeigen ein vergleichbares SIDD-Profil (Benham, 1996). Das spezifische Destabilisierungsmuster, vom Promotor über das Gen bis hin zum Terminator, scheint also sequenzunabhängig, über verschiedene Organismen hoch konserviert zu sein.

Lokale DNA-Denaturierung ist ein bestimmender Schritt bei der Initiation von Replikation und Transkription. Bei zuletzt genannter erleichtert eine lokal vorhandene negative superhelikale Spannung im Promotorbereich das Binden der RNA-Polymerase an den entsprechenden DNA-Matrizenstrang. Durch das Voranschreiten der RNA-Polymerase während der Elongation wird eine Welle positiver Superhelizität vor der Transkriptionsmaschinerie und negative superhelikale Spannung dahinter erzeugt (Liu und Wang, 1987; Tsao *et al.*, 1989). Dieses Phänomen konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden. Eine Ansammlung positiver Superhelizität vor dem Transkriptionskomplex kann ein Voranschreiten der Transkription stark behindern. Eine destabilisierte 3'-Terminatorregion kann jedoch die entstehende Spannung auffangen und so zu einem schnellen Voranschreiten des Polymerase-Transkriptionskomplexes und damit zu einer effektiven Transkription beitragen. Gleichzeitig isoliert ein destabilisierter Terminator das Gen von dessen 3'-gelegenen Nachbarsequenzen, indem er eine Ausbreitung der positiven Superhelizität in umliegende DNA-Bereiche verhindert (Benham, 1996). Solch ein Isolatoreffekt garantiert eine wirkungsvolle Termination der Transkription. Die durch die Transkription entstandene negative Superhelizität im 5'-Bereich des Transkriptionsapparates hat wiederum Einfluss auf die Promotorregion der Gene. Die negative Superhelizität kann zu einer Aufwindung der destabilisierten Promotorsequenz führen und so eine erneute Transkriptionsinitiation erleichtern.

SIDD-Minima konnten auch mit Regionen der chromosomalen Anheftung (*scaffold/matrix attachment regions*; S/MARs) in Verbindung gebracht werden (Benham *et al.*, 1997). Die Anheftung der DNA an nukleäre Matrixproteine dient sowohl der transkriptionellen Verstärkung, als auch der Abgrenzung unabhängig voneinander regulierter DNA-Domänen. Ferner kommen Bereiche mit einem erhöhten Strangtrennungspotential auch an DNA-Bindungsstellen anderer Faktoren, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren und anderen Regulatoren, vor. In einigen Fällen benötigen diese regulatorischen Proteine eine lokal einzelsträngige DNA für die Bindung (Rothman-Denes *et al.*, 1998). Das Vorhandensein von DNA-Einzelsträngen ist dabei eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung von Sekundärstrukturen, welche essentiell für die Interaktion mit bestimmten Proteinen sind.

1.2 Die Bedeutung von DNase I-hypersensitiven Stellen im Chromatin

Fundamentale Prozesse wie Replikation und Transkription werden durch spezifische Interaktionen zwischen nukleären Proteinen und chromosomalen DNA-Sequenzen vermittelt. Die Erkennung von spezifischen DNA-Sequenzen durch Proteine setzt jedoch die Zugänglichkeit der entsprechenden DNA-Bereiche voraus. Seit langem wird angenommen, dass Nukleosom-freie Regionen im Chromatin, bekannt als DNase I-hypersensitive Stellen (HS), „offene Fenster“ repräsentieren, die für *trans*-agierende Faktoren den Zutritt zu entscheidenden *cis*-agierenden DNA-Sequenzen ermöglichen (Elgin, 1981; Reeves, 1984; Eissenberg *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1985; Weintraub, 1985; Pederson *et al.*, 1986; Yaniv und Cereghini, 1986; Gross und Garrard, 1987). Grundsätzlich spiegeln hypersensitive Stellen zwar einen geringen (etwa 1 %), aber hoch selektiven Bestandteil des Genoms wider. HS stellen diejenigen DNA-Bereiche dar, an denen DNase I bevorzugt Doppelstrangbrüche in das Chromatin einfügt. Zu diesen Loci gehören für gewöhnlich kurze, 100-200 bp lange DNA-Sequenzen, welche sich durch eine vielfach erhöhte Sensitivität gegenüber DNase I-Spaltung auszeichnen, als sie inaktives Chromatin aufweist (Wu *et al.*, 1979; Wu und Gilbert, 1981; McGhee *et al.*, 1981; Burch und Weintraub, 1983).

Nuklease-hypersensitive Stellen wurden erstmals bei Untersuchungen an viralen SV40-Chromatinstrukturen entdeckt (Varshavsky *et al.*, 1978; Scott und Wigmore, 1978). Wenig später wurde ihre Gegenwart in zellulärem Chromatin durch Wu und Mitarbeiter (1979) beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass diese Stellen fundamentale Elemente im biologischen System darstellen, da sie ubiquitär bei verschiedensten Eukaryonten, wie Tieren, Pflanzen und Pilzen, aber auch bei viralen Genomen vorkommen (Gross und Garrard, 1988).

Je nach Zelltyp unterscheidet man bei HS zwei verschiedene Kategorien: konstitutiv und induzierbar. Konstitutive Stellen werden oft in den Promotorregionen von Genen gefunden und sind entscheidend für transkriptionelle Induktionsprozesse. Sie sind ohne eine transkriptionelle Aktivierung nachweisbar und unabhängig von der aktuellen Genexpression. Induzierbare HS setzen, wie der Name bereits andeutet, einen Stimulus voraus und sind nur für einen begrenzt andauernden Zeitraum nachweisbar. Sie können ebenfalls vor der Transkription erscheinen und sind oftmals noch lange nach dem Rückgang einer Induktion zu identifizieren. In den meisten Fällen geht ihr Erscheinen mit einer transkriptionellen Aktivierung des entsprechenden Gens einher (Gross und Garrard, 1988). Neben konstitutiven und induzierbaren DNase I-hypersensitiven Stellen wird zusätzlich zwischen Gewebe- und Entwicklungsspezifischen HS unterschieden.

Eine große Vielzahl an funktionellen *cis*-agierenden Sequenzen ist mit hypersensitiven Stellen assoziiert: Promotor- (humaner β -Globin-*cluster*, Groudine *et al.*, 1983), *silencer*- (Hühner Lysozym, Fritton *et al.*, 1984), *enhancer*- (humanes β -Globin, Kollias *et al.*, 1987) und Isolatorelemente (Chung *et al.*, 1993), Lokuskontrollregionen (Forrester *et al.*, 1987) und S/MARs (Cockerill und Garrard, 1986; Mielke *et al.*, 2002). Funktionelle SMARs weisen als charakteristisches Merkmal an ihren Grenzen konstitutive DNase I-Hypersensitivität auf. Zu den häufigsten Proteinen, die mit HS interagieren, zählen neben den Topoisomerasen I/II und der RNA-Polymerase II diverse Transkriptionsfaktoren (Gross und Garrard, 1988).

Die Mechanismen, die zur Ausbildung und zum Erhalt von hypersensitiven Stellen führen sind bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass solche Merkmale wie DNA-Demethylierung, DNA-*looping*, Sequenzzusammensetzung, alternative DNA-Konformationen und/oder superhelikale Spannung eine entscheidende Rolle dabei spielen. In vielen Fällen ist eine Proteinbindung an bestimmte DNA-Sequenzen der entscheidende Schritt. Des Weiteren haben einige Beobachtungen gezeigt, dass auch Nukleosomen oft spezifisch entlang der DNA-Sequenz angrenzend an oder zwischen DNase I-hypersensitiven Stellen positioniert sind (Almer *et al.*, 1986; Wu, 1980; Bode *et al.*, 1986). Entscheidend für die Positionierung von Nukleosomen ist neben der entsprechenden DNA-Sequenz auch der Einfluss benachbarter hypersensitiver Stellen, welche als strukturelle Barrieren fungieren und eine nukleosomale Ausformung limitieren können.

1.3 Das Interferon- β Gen

1.3.1 Interferone und ihre biologische Funktion

Interferone (IFN) sind Cytokine, die ursprünglich durch ihre Fähigkeit definiert wurden, in Zellen einen antiviralen Status zu induzieren (Isaacs und Lindenman, 1957). Neben den antiviralen Effekten (Translations- und Infektionsblockierung; Bode und Hauser, 1990) vermitteln Interferone zudem weitere biologische Aktivitäten bei der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose. Dabei zeigen die Interferone sowohl eine autokrine als auch eine parakrine Wirkungsweise. Aufgrund ihrer biochemischen und molekularen Eigenschaften werden Interferone in zwei Gruppen unterteilt: Typ I und Typ II. In Säugetieren existieren fünf Subtypen der Klasse I Interferone, welche sich zwar in ihrer Primärstruktur und antigenischen Kreuzreaktivität unterscheiden (IFN- α ; IFN- β ; IFN- ω ; IFN- τ sowie IFN- δ), aber alle durch denselben Rezeptor (Interferon-Typ-I-Rezeptor) erkannt werden. Anders als das zum Typ II gehörende und ausschließlich für Mammalia beschriebene IFN- γ , besitzen alle Typ I Interferongene keine Introns (Henco *et al.*, 1985). IFN- γ ist im Gegensatz zu den Klasse I Interferonen säurelabil, bindet an einen eigenen Rezeptor (Interferon-Typ-II-Rezeptor) und wird hauptsächlich in T-Helferzellen gebildet. Typ I Interferone hingegen werden von fast allen Zellen produziert, wobei Monocyten und Macrophagen vorwiegend IFN- α synthetisieren, Fibroblasten dagegen IFN- β . Die Interferone werden jedoch nicht konstitutiv, sondern erst nach Induktion durch z.B. Viren, doppelsträngige RNA (dsRNA), Lipopolysaccharide oder andere Cytokine, wie IL-1 oder TNF- α , exprimiert.

1.3.2 Transkriptionelle Aktivierung des humanen Interferon- β Gens (IFNB1)

Das einzige humane IFNB1 Gen ist neben allen anderen Typ I Interferonen auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (p21-22) in einem Gen-*cluster* lokalisiert. Jedoch weist das IFNB1 Gen dabei eine isolierte, am telomeren Ende des *cluster* gelegene, Positionierung auf (Diaz *et al.*, 1994). Zudem wird die humane IFN- β Domäne durch 5' und 3' liegende S/MAR-Elemente auf eine Länge von 14 kb vom umgebenden Chromatin abgegrenzt (Bode und Hauser, 1990).

Die Induktion durch Viren und dsRNA ist zeitlich begrenzt (transiente Induktion) und benötigt keine Proteinneusynthese. Nach der Induktion hingegen bedarf das Abschalten der Transkription der aktiven Synthese „neuer“ Transkriptionsfaktoren (Whittemore und Maniatis, 1990a und 1990b). Der für die vollständige Induktion des Gens nach Virusinfektion notwendige Bereich des IFN- β Promotors liegt zwischen den Basenpositionen -110 und -36 (relativ zum Transkriptionsstart) und wird als *virus responsive element* (VRE) bezeichnet (Abb. 1.2A). Diese Region vermittelt auch in heterologen Promotorsystemen eine

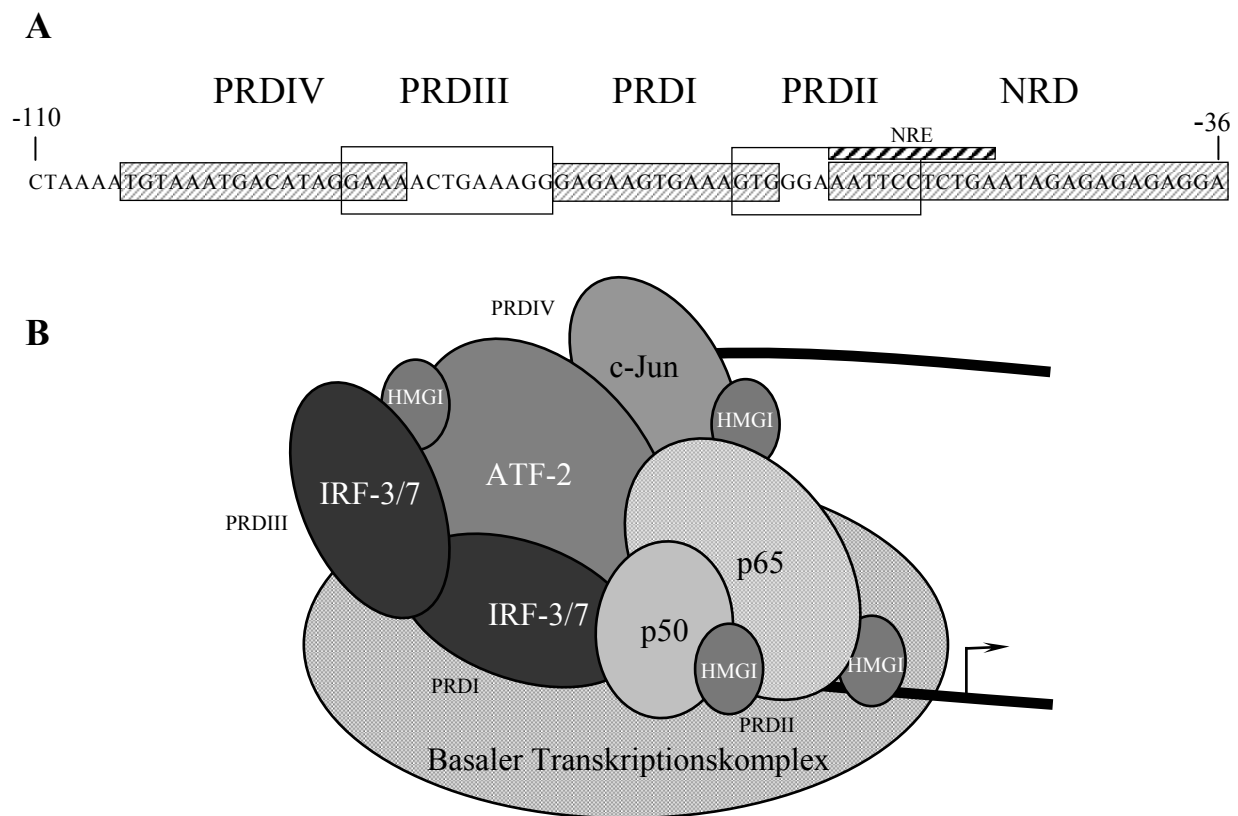


Abb. 1.2 DNA-bindende Faktoren und Elemente des IFN- β Promotors

A) Das *virus response element* (VRE) des IFN- β Promotors. Das VRE besteht aus den vier positiven regulatorischen Domänen PRDII, I-III und IV sowie der negativ regulatorischen Domäne NRD, deren Hauptbestandteil das NRE darstellt. **B)** Modell des *enhanceosomes* am IFN- β Promotor. Der transkriptionelle Aktivator NF- κ B (p50/p65) bindet an PRDII, das Heterodimer aus ATF-2/c-Jun an PRDIV und zwei Moleküle IRF-3 und/oder IRF-7 an PRDI und PRDIII. HMG I(Y)-Proteine binden an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix und bewirken *DNA-bending*. Über zusätzliche Protein-Protein Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren ATF-2/c-Jun und NF- κ B ermöglichen die HMG I(Y)-Proteine eine Konformationsänderung der DNA, die zur Ausbildung des Multiproteinkomplexes notwendig ist. (verändert nach Thanos und Maniatis, 1995b).

orientierungs- und positionsunabhängige Induzierbarkeit durch Viren bzw. dsRNA (Goodbourn *et al.*, 1985; Fujita *et al.*, 1985; Dinter und Hauser, 1987). Innerhalb des VRE wurden verschiedene überlappende regulatorische Domänen identifiziert. Die *positive regulatory domains* (PRDs; PRDI-IV) haben einen positiven Einfluss auf die IFN- β Expression, wohingegen die *negative regulatory domain* (NRD) den Promotor im nicht-induzierten Zustand konstitutiv reprimiert (Zinn *et al.*, 1983; Goodbourn *et al.*, 1986; Goodbourn und Maniatis, 1988; Nourbakhsh *et al.*, 1993). Bei der Induktion werden die Bereiche PRDII, PRDI-III und PRDIV spezifisch durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B (p50/p65), verschiedene IRF-Proteine (IRF-3 und/oder IRF-7) und ein Heterodimer aus ATF-2/c-Jun, erkannt (Thanos und Maniatis, 1995a; Hongmei *et al.*, 2004). Die maximale Aktivierung des IFN- β Promotors wird durch die kooperative Bindung dieser Transkriptionsfaktoren zusammen mit DNA-*bending* induzierenden HMG I(Y)-Proteinen (*high mobility group protein I(Y)*) erreicht. Dieser Multiproteinkomplex wird in seiner Gesamtheit als *enhanceosome* bezeichnet (Kim *et al.*, 1998; Thanos und Maniatis, 1995b; Abb. 1.2B).

In Virus-infizierten Zellen konnten darüber hinaus drei weitere Proteine mit negativen regulatorischen Eigenschaften identifiziert werden, welche die Aktivierung der PRDs im IFN- β Promotor modulieren. Die Faktoren IRF-2 und PRDI-BF1/Blimp-1 binden an die Region PRDI (Harada *et al.*, 1989; Keller und Maniatis, 1991), wohingegen PRDII-BF1 mit PRDII interagiert (Fan und Maniatis, 1989). Untersuchungen von Expressionskinetiken dieser Faktoren konnten zeigen, dass sie am Inaktivierungsmechanismus des IFN- β Promotors nach Virusinduktion beteiligt sind.

Die NRD wurde definiert durch eine sukzessive Verkürzung der *upstream* vom Transkriptionsstart des IFN- β Gens gelegenen Region (Goodbourn und Maniatis, 1988). Innerhalb dieses Bereichs wurde eine 11 bp lange DNA-Sequenz, bezeichnet als *negative regulatory element* (NRE), identifiziert (Nourbakhsh *et al.*, 1993). Das NRE fungiert als konstitutiver und positionsunabhängiger *silencer* der NF- κ B Bindungsstelle (PRDII). Nourbakhsh und Hauser (1997) konnten zeigen, dass *in vitro* der transkriptionelle Repressor NRF (*NF- κ B repressing factor*) konstitutiv am NRE gebunden ist und die Aktivierung des IFN- β Promotors reprimiert, indem NRF spezifisch die transkriptionelle Aktivität des NF- κ B Faktors inhibiert.

Neben der Interaktion von regulatorischen Proteinen mit entsprechenden DNA-Bindungsplätzen spielt zusätzlich die strukturelle Umordnung des Chromatins bei der Expression von Genen eine entscheidende Rolle. Eine besondere Position nehmen dabei die Nukleosomen ein. Deren Histonkomponenten können an N-terminalen Lysinresten eine Vielzahl an verschiedenen Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung erfahren. Ferner können bestimmte Serin- bzw. Threoninreste phosphoryliert werden. Derartige Veränderungen können nachhaltig die Chromatinstruktur und die transkriptionelle Regulation von Gendomänen beeinflussen. Shestakova und Mitarbeiter (2001) konnten beobachten, dass die Acetylierung von H4-Histonen auch beim Regulationsmechanismus des IFN- β Promotors von Bedeutung ist. Grundsätzlich werden acetylierte

Histonreste in transkriptionell aktiven Bereichen des Chromatins gefunden, während die deacetylierte sowie methylierte Form der Histone vor allem in transkriptionell reprimierten Regionen vorkommt (Imhof und Wolffe, 1998).

Einige der hier aufgeführten Beobachtungen zur transkriptionellen Aktivierung des humanen IFNB1 Gens wurden bisher nur für das murine System beschrieben. Auf wissenschaftlicher Ebene besteht jedoch die Auffassung, dass der Regulationsmechanismus für den IFN- β Promotor bei Mensch und Maus aufeinander übertragbar ist.

1.4 Aufgabenstellung

Ziel dieser Promotionsarbeit war die biochemische Verifizierung des SIDD-Algorithmus als Vorhersageprogramm zur Identifizierung spezifischer DNA-Bindungsstellen in nicht-kodierenden DNA-Bereichen. Im Zuge des Humangenomprojekts konzentrierten sich bisherige wissenschaftliche Arbeiten primär auf die Analyse von kodierenden DNA-Regionen bzw. deren proximalen Promotorsequenzen.

Als Modell diente ein etwa 5 kb umfassender Kontrollbereich *upstream* des humanen IFN- β Promotors. Das SIDD-Profil (Abb. 1.1) dieser DNA-Sequenz wies drei, in regelmäßigen Abständen zueinander angeordnete destabilisierte Bereiche auf, welche durch vorangegangene Untersuchungen mit DNase I-Hypersensitivität in Zusammenhang gebracht werden konnten. Letzteres deutete dabei auf das Vorhandensein von regulatorisch relevanten DNA-Abschnitten in Bereichen von SIDD-Minima hin. Entsprechend sollten spezifische Protein-DNA Komplexe mit DNA-Fragmenten aus den beschriebenen Regionen mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) identifiziert und die DNA-bindenden Proteine im Anschluss charakterisiert werden. Potentielle regulatorische Einflüsse spezifischer Transkriptionsfaktorbindungsstellen sollten darüber hinaus anhand geeigneter Reportergenkonstrukte mit entsprechenden Mutationen in heterologen Zellsystemen untersucht werden.

Zusätzlich zur Identifizierung von spezifischen DNA-Erkennungssequenzen innerhalb von destabilisierten DNA-Bereichen der humanen Kontrollsequenz, sollte die Transferierbarkeit dieser Daten auf den analogen murinen Sequenzabschnitt überprüft werden. Hierzu sollten SIDD-Profile entsprechender DNA-Regionen generiert und vergleichbar destabilisierte Bereiche auf das Vorkommen von konservierten DNA-Motiven hin, anhand von EMSA-Studien, analysiert werden.

2. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war das Vorhersagepotential strukturgebender Signale im eukaryontischen Genom, bezüglich regulatorischer Funktion und/oder Proteinassoziation, zu verifizieren. Als Untersuchungsobjekt wurde insbesondere die humane Interferon- β Domäne (IFNB1-Domäne) im Detail charakterisiert. Ausgehend von dem in der Einleitung vorgestellten SIDD-Algorithmus konzentrierte sich die Studie hauptsächlich auf drei dominante, destabilisierte Regionen innerhalb eines etwa 5 kb großen intergenischen Kontrollbereichs *upstream* des Promotors für das Interferon- β (IFN- β) Gen. Für Untersuchungen im Hinblick auf Protein-DNA Interaktionen und die Identifizierung potentieller Proteinkandidaten sind im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche Methoden wie Kernextraktpräparationstechniken, *elektrophoretic mobility shift assays* (EMSA), verschiedene DNA-Affinitätschromatographieverfahren und ein Hefesystem (*Yeast One-Hybrid*) zur direkten Identifizierung von spezifisch DNA-bindenden Proteinen etabliert und optimiert worden.

Zudem wurde der regulatorische Einfluss einzelner DNA-Bereiche bzw. der identifizierten DNA-bindenden Proteine auf den induzierbaren IFN- β Promotor näher untersucht. Hierzu wurden verschiedene Reportergenkonstrukte stabil in das Genom von murinen LM(Tk)-Zellen integriert und in Virusinduktionsexperimenten getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im zweiten Teil dieses Kapitels beschrieben.

2.1 Nachweis von spezifischen Protein-DNA Interaktionen im Kontrollbereich der IFNB1-Domäne

Die signifikanten destabilisierten Regionen im SIDD-Profil (Abb. 1.1) des hier untersuchten Kontrollbereichs der IFNB1-Domäne unterstreichen die Tendenz zur Einzelstrangtrennung der jeweiligen DNA-Abschnitte unter negativer Superhelizität (Benham *et al.*, 1997; Bode *et al.*, 2000a), lassen jedoch noch keine Schlüsse auf eventuell assoziierte Proteine zu. Erst eine nahezu übereinstimmende Lokalisierung von DNase I-hypersensitiven Stellen mit den destabilisierten Regionen impliziert die Beteiligung eines regulatorischen Proteinbesatzes (Bode *et al.*, 2000b), da DNase I-Hypersensitivität als Hinweis für *cis*-agierende regulatorisch relevante Elemente, wie Promotor-, *enhancer*-, *silencer*-, *insulator*-, S/MAR- (*scaffold/matrix attachment region*) und Locus Kontrollregionen (LCR), gilt (Gross und Garrard, 1988).

Zu Beginn sollten systematische EMSA (*elektrophoretic mobility shift assay*)-Studien mit humanen MG63-Kernextrakten dazu beitragen, spezifische Protein-DNA Komplexe (*shifts*) für die entsprechenden destabilisierten Regionen zu ermitteln. Aufgrund ihrer Hypersensitivität gegenüber DNase I werden die drei dominanten SIDD-Minima, *upstream* des humanen IFN- β Promotors, im Folgenden mit HS1, HS2 und HS3 (distal \rightarrow proximal) bezeichnet.

2.1.1 Identifizierung spezifischer Protein-DNA Komplexe innerhalb der destabilisierten Region HS2

Unter den drei Regionen HS1 (275 bp), HS2 (275 bp) und HS3 (325 bp) zeigt die Region HS2 im SIDD-Profil (Abb. 1.1) die stärkste Destabilisierung. Daher wurde zunächst dieser Bereich, repräsentativ für alle drei, auf spezifische, DNA-bindende Proteine hin untersucht.

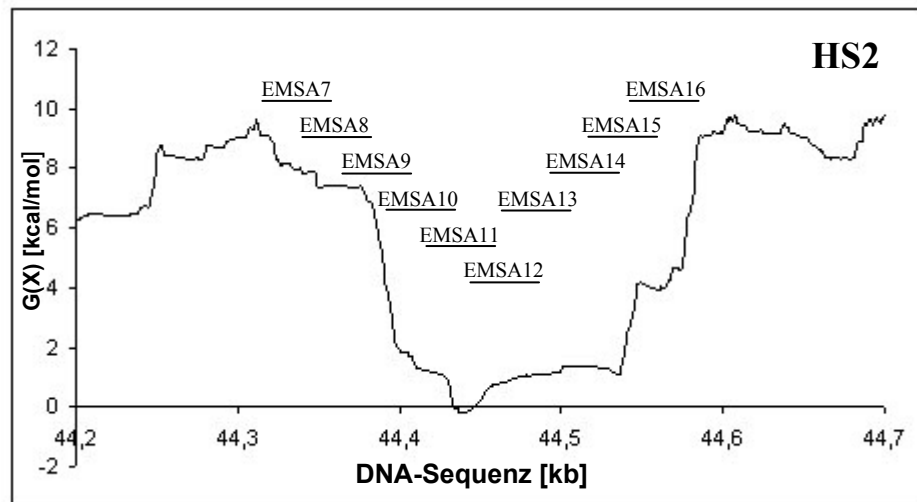


Abb. 2.1 SIDD-Profil des dominant destabilisierten Bereichs HS2

Eingetragen sind die in EMSA-Studien verwendeten Oligonukleotide (50-mere), die den kompletten destabilisierten Bereich überspannen.

Hierfür wurden, wie in Abbildung 2.1 gezeigt, überlappende Oligonukleotide mit einer Länge von 50 bp synthetisiert, die den gesamten Bereich der HS2 überspannen. Da der Über-

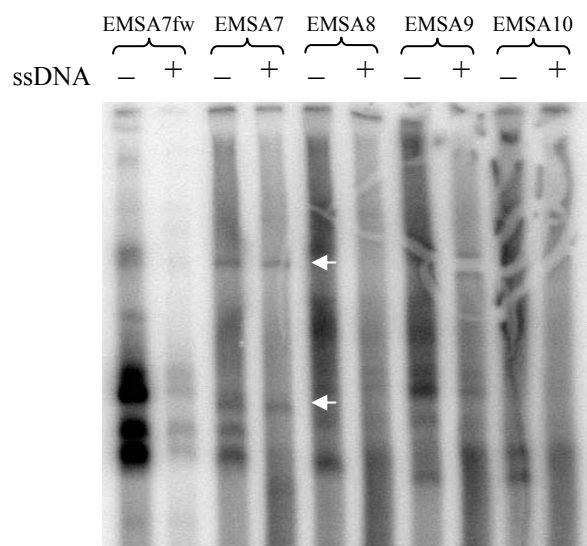


Abb. 2.2 EMSA Faktor-screening in HS2

Analytischer EMSA zur Identifizierung von spezifisch DNA-bindenden Proteinen in humanen MG63-Kernextrakten. EMSA7fw zeigt unspezifisch Einzelstrang-bindende Proteine in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) eines unspezifischen Einzelstrangkompeters (ssDNA; 200-fach molarer Überschuss). Die folgenden Reihen repräsentieren die getesteten Oligo-Sonden EMSA7 bis 10, die sich aus einem Gemisch an Einzel- und Doppelsträngen zusammensetzen. Die weißen Pfeile zeigen spezifische *shifts* der Sonde EMSA7.

hang zum benachbarten Oligonukleotid immer 25 bp beträgt, kann gewährleistet werden, dass keine essentiellen DNA-Erkennungssequenzen, die möglicherweise am 5'- bzw. 3'-Ende abgeschnitten sind, unberücksichtigt bleiben. Alle DNA-Fragmente wurden in EMSA-Experimenten (siehe 4.9.3) im Hinblick auf spezifische Proteininteraktionen untersucht. Von den verwendeten DNA-Sonden zeigt nur das Oligonukleotid EMSA7 zwei spezifische *shifts* (Abb. 2.2) mit humanen MG63-Kernextrakten. Die EMSA8-16 DNA-Fragmente hingegen weisen nur unspezifische, durch Einzelstrang-bindende Proteine hervorgerufene, Protein-DNA Komplexe auf (Daten für EMSA8-10 in Abb. 2.2; Daten für EMSA11-16 nicht gezeigt). Da

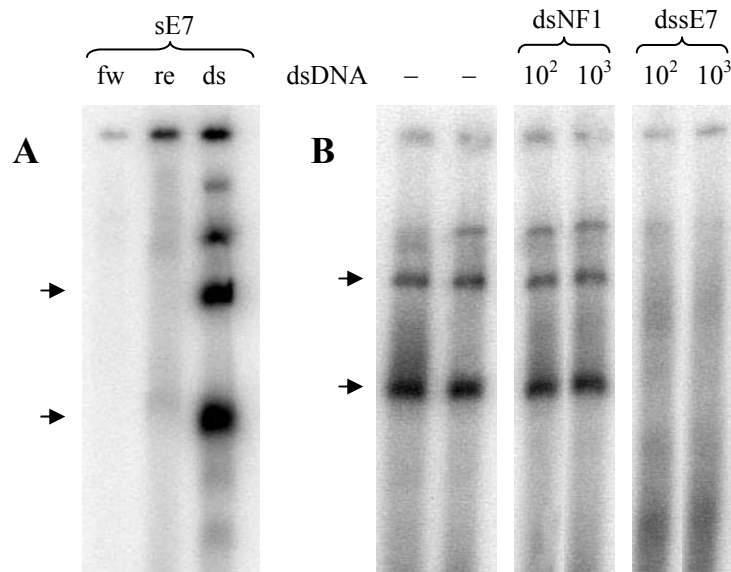


Abb. 2.3 Verifizierung der Strangspezifität

EMSA-Studien zur Bestimmung des DNA-Bindungscharakters. **A)** Aufgetragen sind die komplementären Einzelstrangsonden sE7-*forward* (fw) bzw. -*reverse* (re) und der sE7 DNA-Doppelstrang (ds) in Anwesenheit eines 200-fach molaren Überschusses an unspezifischem Einzelstrangkompetitor. Die spezifischen *shifts* (schwarze Pfeile) sind nur bei der Doppelstrangsonde zu erkennen und somit Doppelstrang-spezifisch. **B)** Dieser Kompetitions-EMSA, durchgeführt mit 100-fach (10²) und 1000-fach (10³) molarem Überschuss an unspezifischem (dsNF1) bzw. spezifischem (dssE7) DNA-Doppelstrang (dsDNA), erlaubt eine Affinitätsabschätzung der jeweiligen Protein-DNA Interaktionen der ds sE7-Sonde.

EMSA8, verglichen mit EMSA7, keine spezifischen Proteinbindungen zeigt, müssen die für die Proteininteraktion verantwortlichen DNA-Sequenzen zwangsläufig auf dem 5'-Überhang von EMSA7 bzw. Übergangsbereich zwischen EMSA7 und 8 lokalisiert sein (vgl. Abb. 2.1). Um nachfolgend die DNA-Sequenzen näher einengen zu können, die für die EMSA7-spezifischen *shifts* verantwortlich sind, wurde das EMSA7 50-mer auf eine Länge von 30 Basenpaaren, vom 3'-Ende her, verkürzt (*short* EMSA7 (sE7)) und im EMSA auf Proteinbindung überprüft (siehe Abb. 2.3A und B).

Die bisher gezeigten EMSA-Daten lassen den Schluss zu, dass es zwei spezifische Protein-EMSA7 Wechselwirkungen gibt, doch welchen Charakter (Doppel- oder Einzelstrangbindung) diese Interaktionen haben, kann hiermit nicht geklärt werden. Aufschluss über das genaue Bindungsverhalten gibt der EMSA in Abbildung 2.3A. In diesem Versuch ist deutlich zu erkennen, dass die bekannten Protein-DNA Komplexe ausschließlich mit der doppel-

strängigen Sonde generiert werden können. Sowohl DNA-Doppelstrang-, als auch DNA-Einzelstrang-erkennende Proteine zeigen individuell unterschiedliche Affinitäten für ihre entsprechenden DNA-Erkennungssequenzen. Wie hoch diese Affinitäten im Falle der hier identifizierten DNA-Doppelstrangbinder sind, lässt sich anhand des in Abbildung 2.3B gezeigten Kompetitions-EMSA mit der verkürzten doppelsträngigen sE7 Sonde (dssE7) erahnen. Ein 100-fach molarer Überschuss an nicht radioaktiv-markierter dssE7 DNA resultiert in einem vollständigem Verschwinden der spezifischen Signale, wohingegen sogar ein 1000-facher Überschuss eines unspezifischen DNA-Doppelstrangs (ds NF1) keinen Einfluss auf die Interaktion ausübt. Dies suggeriert eine relativ hohe Bindungsaffinität der beteiligten Faktoren für die jeweils spezifische DNA-Erkennungsregion.

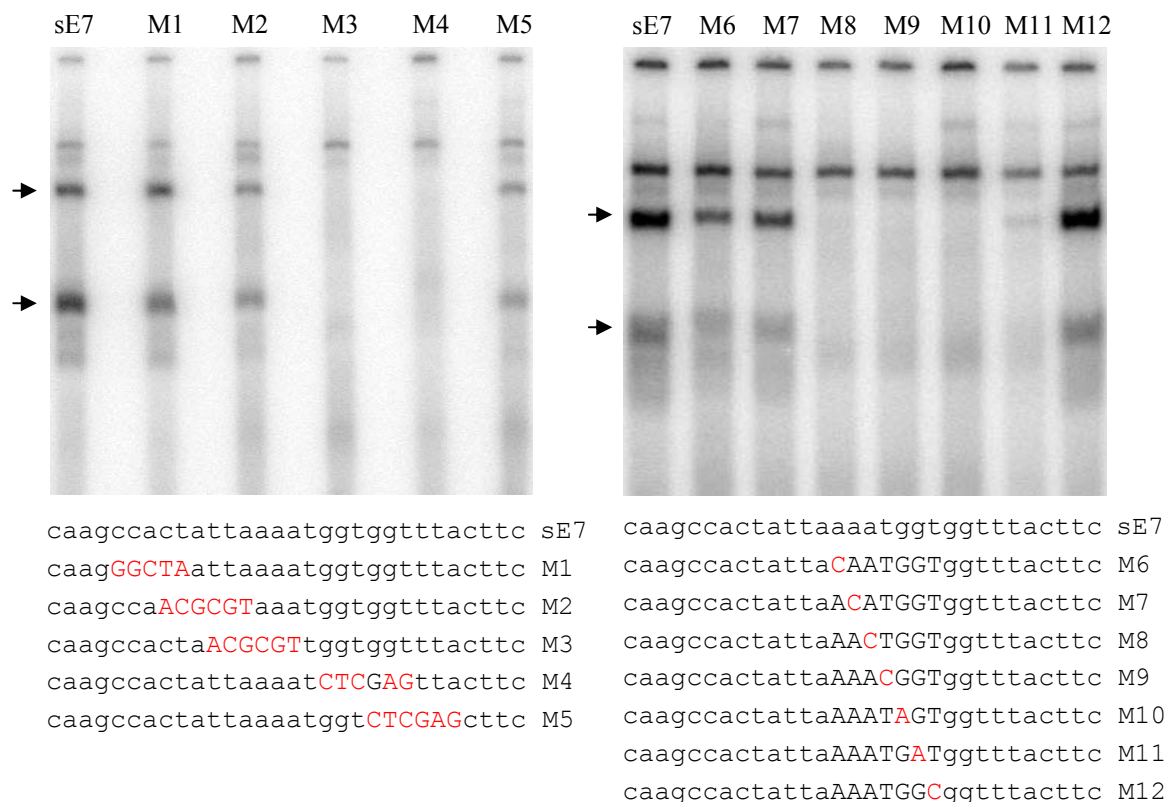


Abb. 2.4 Mutationsanalysen zur Einengung der spezifischen DNA-Erkennungsregion in HS2

Gezeigt sind die in EMSA-Studien eingesetzten Oligonukleotidsequenzen mit den entsprechenden Autoradiogrammen. Die Abkürzungen sE7 (Wildtyp), M1-M5 (5-6-fach Mutationen) und M6-M12 (Punktmutationen) stehen repräsentativ für die hier eingesetzten radioaktiv-markierten DNA-Doppelstrangsonden. Die EMSAs veranschaulichen die Bedeutung bestimmter DNA-Bereiche für die Interaktion mit den spezifischen DNA-bindenden Proteinen in MG63-Kernextrakten (siehe schwarze Pfeile).

Zur weiteren Einengung, der für die hier beschriebenen Proteininteraktionen relevanten DNA-Sequenzen, wurden sukzessive 5-6 Basenpaare betreffende Mutationen innerhalb der sE7 Sequenz eingefügt und mittels EMSA (Abb. 2.4) hinsichtlich der spezifischen Protein-*shifts* überprüft. Es ist deutlich zu erkennen, dass der zentral mutierte Bereich der sE7 Mutanten M3 und M4 die spezifischen Protein-DNA Wechselwirkungen komplett aufhebt, wohingegen die Mutanten M1, M2 und M5 die Protein-DNA Interaktionen nur schwach oder

gar nicht beeinflussen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Sequenz zwischen den Basen 13-20 (5'-AAATGGT-3'), die DNA-Bindungsmotive für die hier gefundenen Faktoren beinhaltet.

Um abschließend die spezifische DNA-Erkennungssequenz auf die Base genau bestimmen zu können, wurde der zentrale Bereich des sE7 Oligomers zwischen den Basen 13-20 über Punktmutationen, wie in Abbildung 2.4 gezeigt, substituiert (Adenin- und Thymin gegen Cytosinreste bzw. Guanin- gegen Adeninreste). Der nachfolgende EMSA (Abb. 2.4) verdeutlicht, dass die beiden spezifischen *shifts* gemeinsam durch die Basensubstitutionen M8-M11 verschwinden und unterstreicht somit die Signifikanz eines zentralen 5'-ATGG-3' *core*-Motivs (sE7 *core*-Motiv) für die beiden beschriebenen Protein-DNA Komplexe. Auch die beiden benachbarten Mutationen M6 und M7 scheinen, verglichen mit sE7 und M12, die Affinität zwischen Protein und DNA leicht zu vermindern.

Ob es sich hierbei um zwei verschiedene DNA-bindende Faktoren mit derselben DNA-Erkennungssequenz oder um unterschiedliche Proteinkomplexe eines DNA-Interaktionsvermittelnden Proteins handelt, wird in Abschnitt 2.4 beantwortet. Interessant ist außerdem die Beobachtung, dass Zellkernextrakte verschiedener humaner Zelllinien die gleichen spezifischen Protein-DNA Komplexe aufweisen (Daten nicht gezeigt). Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei den hier beschriebenen DNA-bindenden Proteinen um ubiquitär exprimierte Faktoren handeln könnte.

2.1.2 Identifizierung spezifischer Protein-DNA Komplexe innerhalb der destabilisierten Regionen HS1 und HS3

Die destabilisierte Region HS1 umfasst, ebenso wie die zuvor charakterisierte Region HS2, 275 bp, zeigt aber im Vergleich zu HS2 und HS3 ein etwas schwächeres SIDD-Potential (vgl. Abb. 1.1). Für ein Faktor-*screening* wurden ebenso zunächst überlappende Oligonukleotide

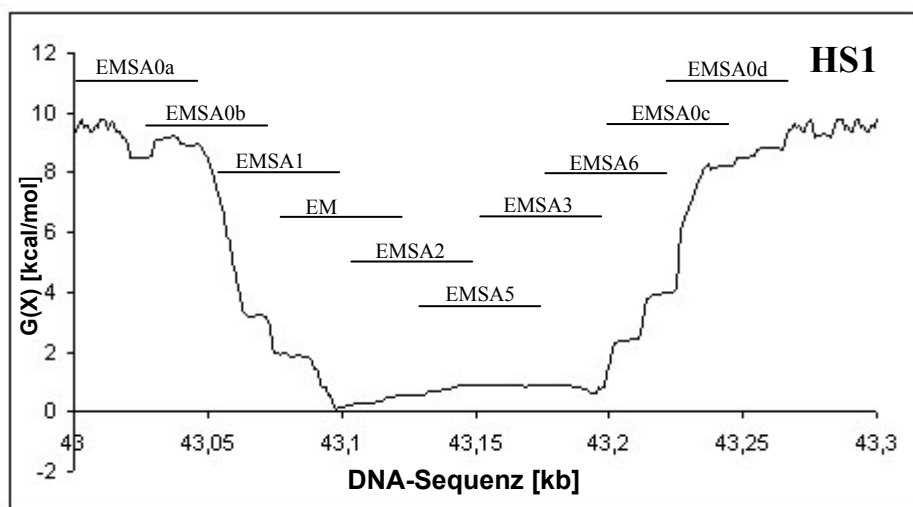


Abb. 2.5 SIDD-Profil des dominant destabilisierten Bereichs HS1

Eingetragen sind die in EMSA-Studien verwendeten Oligonukleotide (50-mere), die den kompletten destabilisierten Bereich überspannen.

(50-mer), die auch die gesamte destabilisierte Sequenz überspannen (Abb. 2.5), synthetisiert und in analytischen EMSA-Experimenten mit MG63-Kernextrakt auf Proteinbindung getestet. Dabei zeigen sich für HS1 mehrere Auffälligkeiten. Die zentral gelegenen Sonden EMSA1-6 weisen keine spezifischen Proteininteraktionen auf, zeichnen sich aber durch ihren extrem hohen AT-Gehalt (rund 79%) aus. Dieses Sequenzmerkmal und die jeweilige Basenverteilung innerhalb des Oligonukleotids führen stets dazu, dass die komplementären Stränge von EMSA4-6, selbst nach mehrstündigem *annealing*, nahezu keine DNA-Doppelstränge ausbilden können. Lediglich die überlappenden DNA-Sequenzen von EMSA1-3 weisen größere Mengen doppelsträngiger DNA auf (Daten nicht gezeigt). Die peripher gelegenen DNA-Fragmente EMSA0a-d hingegen bilden moderate Mengen an DNA-Doppelsträngen aus und zeigen zudem

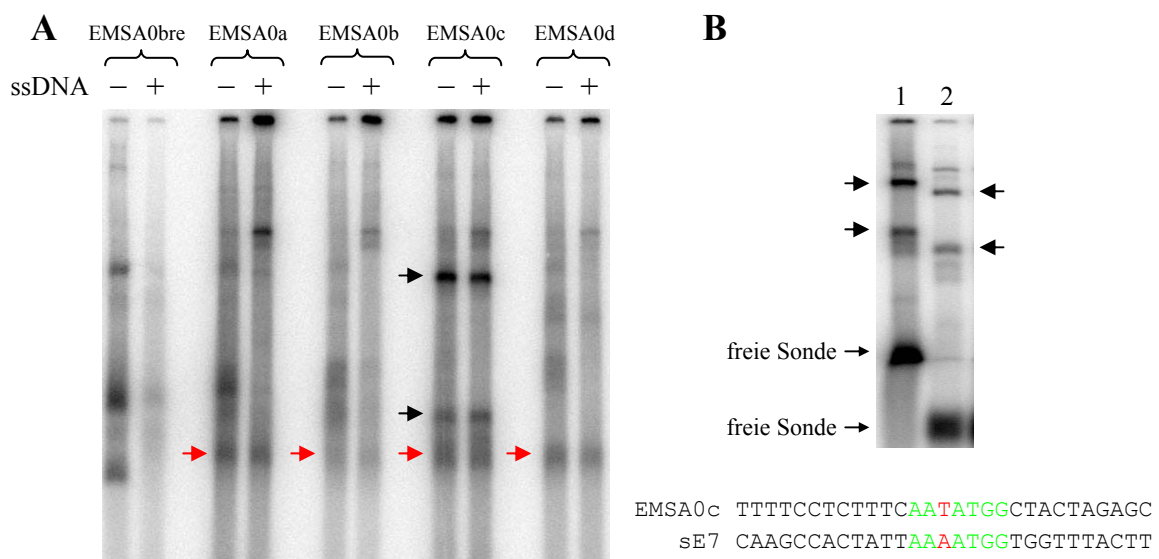


Abb. 2.6 EMSA Faktor-screening in HS1

A) Analytischer EMSA zur Identifizierung von spezifisch DNA-bindenden Proteinen in humanen MG63-Kernextrakten. EMSA0bre zeigt unspezifisch Einzelstrang-bindende Proteine in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) eines unspezifischen Einzelstrangkompetitors (ssDNA; 200-fach molarer Überschuss). Die folgenden Reihen repräsentieren die getesteten Oligo-Sonden EMSA0a-d, die sich aus einem Gemisch an DNA-Einzel- und Doppelsträngen zusammensetzen. Spezifische *shifts* sind mit schwarzen (starke Signale) und roten Pfeilen (schwache Signale) markiert. **B)** Paralleler EMSA mit EMSA0c (50-mer; Reihe 1) und sE7 (30-mer; Reihe 2). Schwarze Pfeile zeigen die beiden identischen Protein-DNA Komplexe. Sequenzvergleich mit markiertem Konsensus-Motiv (grün) und Basenaustausch (rot).

auch spezifische Proteinassoziationen. Neben einem sehr schwachen Signal, welches bei allen vier Sequenzen (rote Pfeile, Abb. 2.6A) vorkommt, zeigt EMSA0c zusätzlich zwei deutliche, spezifische Protein-DNA Komplexe (schwarze Pfeile, Abb. 2.6A). Die letztgenannten entsprechen exakt dem *shift*-Muster der doppelsträngigen sE7 Sonde aus HS2 (Abb. 2.6B). Ein anschließender Sequenzvergleich der DNA-Fragmente von EMSA0c und sE7 belegt, dass es sich bei den EMSA0c-assoziierten Faktoren um die gleichen DNA-Doppelstrang-bindenden Proteine handelt, die zuvor für HS2 beschrieben worden sind, denn beide DNA-Sequenzen

beinhalten nahezu die gleiche DNA-Erkennungsregion (Abb. 2.6B; vgl. auch Abb. 2.4). Bei den in beiden Fällen zentral gelegenen Heptamer-Motiven, welche jeweils das 5'-ATGG-3' sE7 *core*-Motiv tragen, unterscheiden sich die Sequenzen lediglich in einer Base, deren Position, laut zuvor durchgeführter Mutationsanalyse (siehe Abb. 2.4), nicht oder kaum kritisch für die Protein-DNA Interaktion ist. Die benachbarten Oligonukleotide EMSA6 und EMSA0d (siehe Abb. 2.5) können diese spezifischen Protein-*shifts* nicht zeigen, da die entsprechenden DNA-Erkennungssequenzen zu sehr an den entsprechenden 5'- bzw. 3'-Enden der beiden DNA-Fragmente gelegen sind.

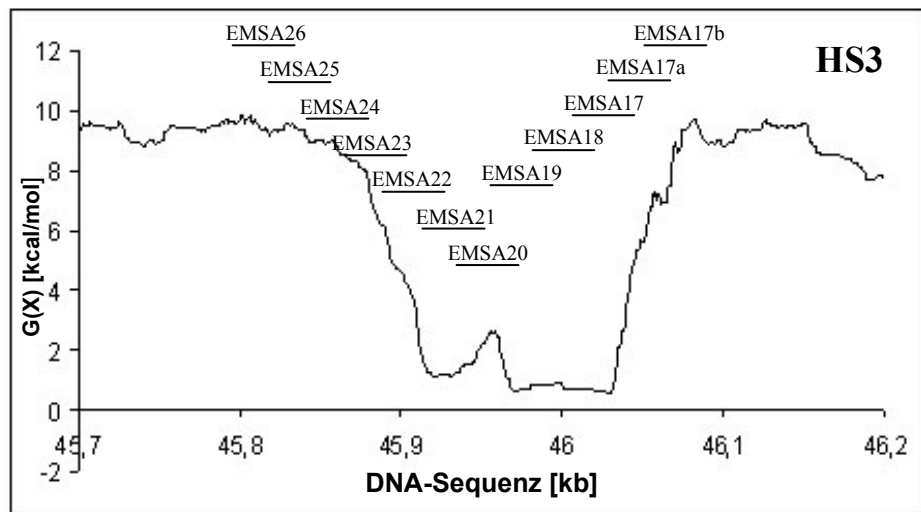


Abb. 2.7 SIDD-Profil des dominant destabilisierten Bereichs HS3

Eingetragen sind die in EMSA-Studien verwendeten Oligonukleotide (50-mere), die den kompletten destabilisierten Bereich überspannen.

Abschließend wurde auch die dritte, Promotor-proximale, destabilisierte Region HS3 einem Faktor-*screening* unterzogen. Abgesehen davon, dass sie mit einem Basenumfang von 325 bp das größte der drei beschriebenen DNase I-hypersensitiven Areale darstellt, würde sie nach herkömmlicher Auffassung, aufgrund der räumlichen Nähe zum Promotor, als bevorzugte Region, bezüglich der Assoziation regulatorisch wirksamer Proteine gelten. Abbildung 2.7 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des SIDD-HS3 Minimums (vgl. Abb. 1.1) mit den Positionen aller zum *screening* eingesetzten DNA-Fragmente (50-mere).

Für die analytischen EMSA-Experimente wurde zunächst erneut als Ressource nukleärer Proteine humaner MG63-Kernextrakt verwendet. Bereits das erste Autoradiogramm der EMSA-Studie mit den Sonden EMSA17-20 zeigt eine spezifische Protein-DNA Interaktionsbande für die benachbarten DNA-Fragmente EMSA18 und 19 (Faktor A, Abb. 2.8A). Eine Wiederholung dieses Experiments mit einem 5 %igen, statt eines 8 %igen, nativen Polyacrylamidgels, bestätigt diesen Befund bei einer deutlich besseren Auftrennung der Protein-DNA Komplexe (Abb. 2.8B).

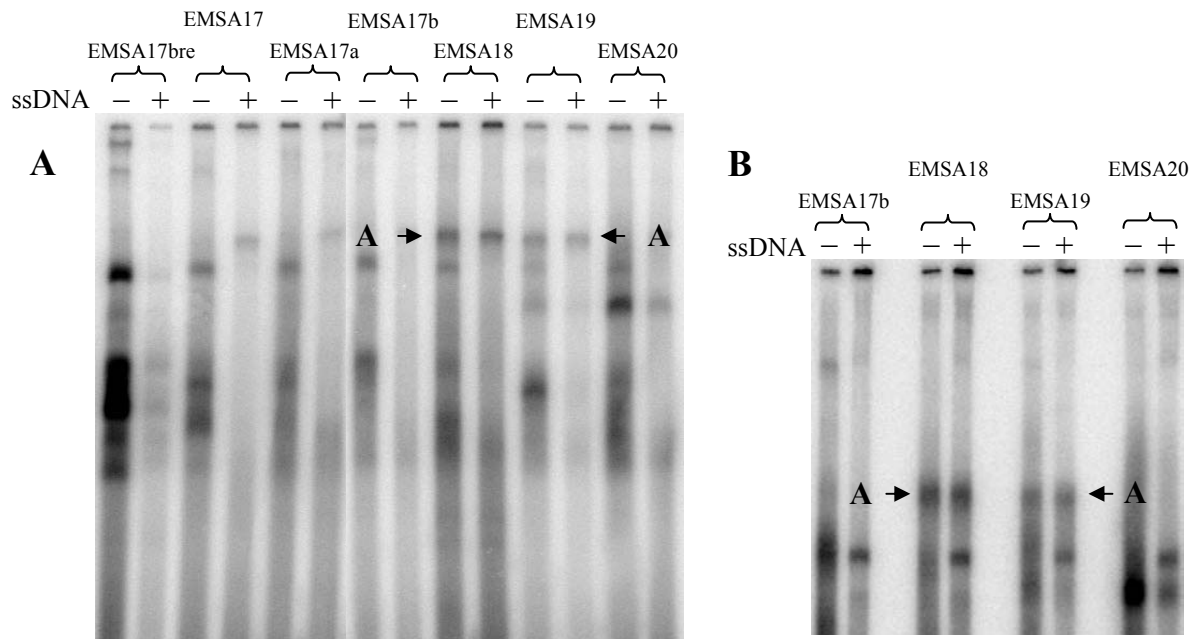


Abb. 2.8 EMSA Faktor-screening der Sonden EMSA17-20 in HS3

A) Analytischer EMSA (8 %ig) zur Identifizierung von spezifisch DNA-bindenden Proteinen aus humanen MG63-Kernextrakten. EMSA17bre zeigt unspezifisch Einzelstrang-bindende Proteine in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) eines unspezifischen Einzelstrangkompetitors (ssDNA; 200-fach molarer Überschuss). Die folgenden Reihen repräsentieren die getesteten Oligo-Sonden EMSA17 bis 20, die sich aus einem Gemisch an DNA-Einzel- und Doppelsträngen zusammensetzen. Spezifische *shifts* sind mit schwarzen Pfeilen markiert (Faktor A). B) Analytischer EMSA (5 %ig) zur besseren Auftrennung der Protein-DNA Komplexe des Faktors A. Spezifische *shifts* sind mit schwarzen Pfeilen markiert.

Die relativ schwache Signalintensität der retardierten Sonden deutet auf eine sehr niedrige Konzentration der assoziierten Proteine im verwendeten Kernextrakt hin. Variiert man jedoch die Versuchsbedingungen und setzt Kernextrakte mit größerem Proteingehalt aus humanen MG63- bzw., protokollbedingt, aus Hamsterzellen (CHO) ein, so fallen signifikante Unterschiede beim Bindungsverhalten des DNA-Fragments EMSA18 auf (Abb. 2.9). Bei dem

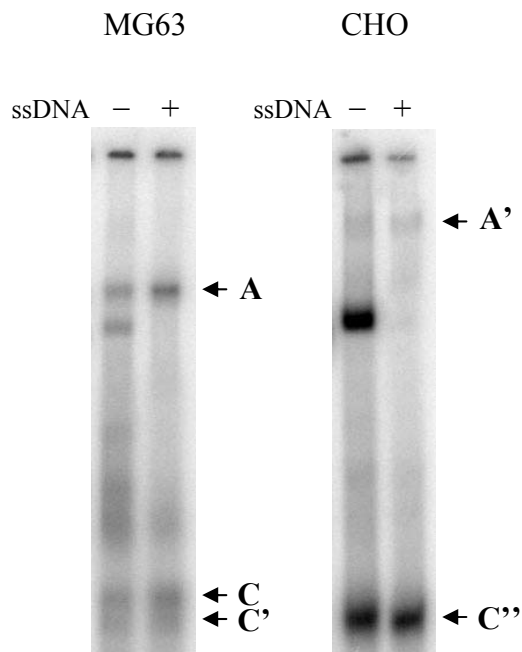


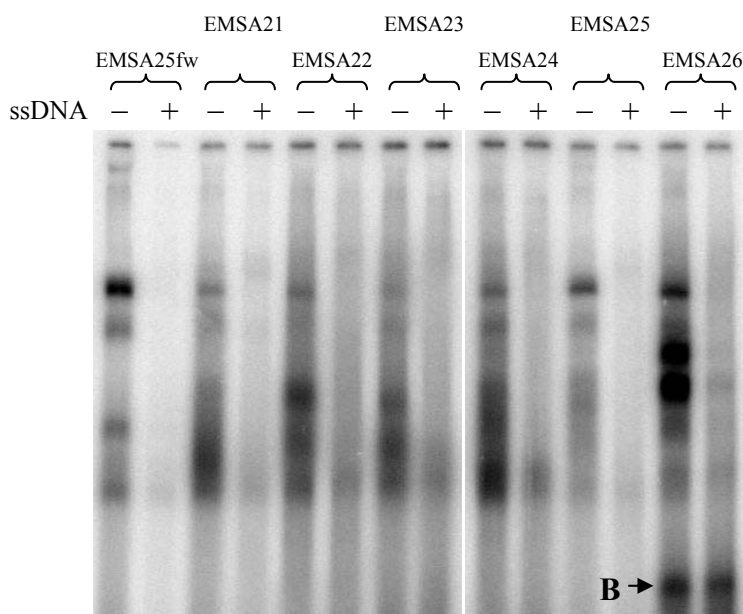
Abb. 2.9 EMSA18-Assoziation bei verschiedenen Kernextrakten

Der EMSA zeigt die unterschiedlichen *shift*-Profile der EMSA18-Sonde in Gegenwart von humanem MG63- (links) und Hamster- (CHO) Kernextrakt (rechts) in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) eines unspezifischen Einzelstrangkompetitors (ssDNA; 200-fach molarer Überschuss). Die Pfeile markieren die jeweils spezifischen DNA-Protein Komplexe.

neu präparierten MG63-Kernextrakt erscheinen zusätzlich zu Faktor A (vgl. Abb. 2.8) weitere spezifische, schwache Banden, während der CHO-Extrakt ein beinahe komplett anderes *shift*-Muster ergibt. Neben einem sehr stark retardiertem Faktor A', implizieren im unteren Bereich des Gels, auf nahezu gleicher Höhe, laufende Banden (Faktor C, C' bzw. C''), das Vorhandensein von spezieübergreifenden, konservierten DNA-bindenden Proteinen.

Zusammenfassend lässt sich für die hier dargestellten Beobachtungen zu den verschiedenen Kernextrakten festhalten, dass neben der Herkunft (Organismus) besonders die Qualität des für die EMSA-Studien eingesetzten Kernextrakts entscheidend ist und maßgeblich über Erfolg oder Misserfolg bestimmt (siehe Diskussion).

Weitere Untersuchungen bezüglich der hier für EMSA18 beobachteten Protein-Assoziationen (vgl. Abb. 2.9) wurden thematischer Hauptbestandteil einer Diplomarbeit (Stellamanns, 2005). Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass der zunächst nur für EMSA18 und EMSA19 beschriebene Faktor A (vgl. Abb. 2.8) auch spezifisch an die benachbarten DNA-Fragmente EMSA20-24 binden kann. Dieses Ergebnis gilt sowohl für MG63-, als auch für CHO-Kernextrakte. Darüber hinaus wurde die Protein-DNA Interaktion der in Abbildung 2.9 mit C/C' bzw. C'' gekennzeichneten Komplexe spezieübergreifend (Mensch/Hamster), neben EMSA18, auch für EMSA19 beschrieben. Für beide Faktoren konnte die essentielle DNA-Erkennungsregion erheblich eingegrenzt werden.



2.10 EMSA Faktor-screening der Sonden EMSA21-26 in HS3

Gezeigt ist ein analytischer EMSA zur Identifizierung von spezifisch DNA-bindenden Proteinen aus humanen MG63-Kernextrakten. EMSA25fw zeigt unspezifisch Einzelstrang-bindende Proteine in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) eines unspezifischen Einzelstrangkompeters (ssDNA; 200-fach molarer Überschuss). Von den getesteten Sonden zeigt nur EMSA26 einen spezifischen Protein-*shift* (Faktor B, schwarze Pfeil).

Das Autoradiogramm der EMSA-Analyse von den bisher noch nicht getesteten Sonden EMSA21-26 weist unter Verwendung von humanem MG63-Kernextrakt nur für das DNA-Fragment EMSA26 einen spezifischen Protein-DNA Komplex auf (Faktor B,

Abb. 2.10). Dieser spezifische EMSA-*shift* der Sonde EMSA26 (Faktor B) wurde in der vorliegenden Arbeit weiter charakterisiert. EMSA-Studien mit verkürzten DNA-Fragmenten (30-mere, sE26), in Bezug auf die Strangspezifität dieses Protein-DNA Komplexes, ergeben, dass es sich hierbei um ein spezifisch den *reverse*-Strang (sE26re) erkennendes Protein handelt, da der erwartete Protein-*shift* ausschließlich beim Gegenstrang zu beobachten ist (Abb. 2.11A). Nähere Untersuchungen zur Strangspezifität von Faktor B in Kompetitions-EMSA Analysen enthüllen sogar noch mehr spezifisch assoziierte Proteine am DNA-Fragment sE26re. So zeigt Abbildung 2.11B nach dem Verschwinden eines unspezifischen Protein-DNA Komplexes zusätzlich drei weitere Banden (Faktor D, D' und D''), welche die Gegenwart eines 200-fach molaren Überschuss an unspezifischem Einzelstrangkompetitor tolerieren. Dass hingegen ein 2000-facher Überschuss alle Signale abschwächt, liegt im Bereich des Erwarteten, ebenso das Verschwinden aller spezifischen Banden bei Zugabe eines 200-2000-fach molaren Überangebots an nicht radioaktiv-markierter, einzelsträngiger sE26re-DNA.

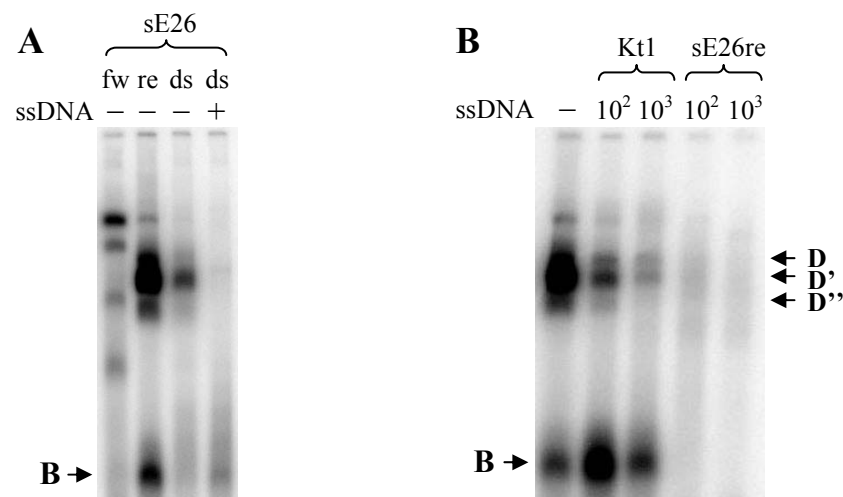


Abb. 2.11 Verifizierung der Strangspezifität

EMSA-Studien zur Bestimmung des DNA-Bindungscharakters. **A)** Aufgetragen sind die komplementären Einzelstrangsonden sE26-*forward* (fw) bzw. -*reverse* (re) und der sE26 DNA-Doppelstrang (ds) in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) eines 200-fach molaren Überschusses an unspezifischem Einzelstrangkompetitor. Der spezifische *shift* (Faktor B) ist nur bei der *anti-sense* sE26 Sonde (sE26r) zu erkennen und somit Einzelstrang-spezifisch. **B)** Dieser Kompetitions-EMSA, durchgeführt mit 100-fach (10^2) und 1000-fach (10^3) molarem Überschuss an unspezifischem (Kt1) bzw. spezifischem (sE26re) DNA-Einzelstrang (ssDNA), erlaubt eine Affinitätsabschätzung der jeweiligen Protein-DNA Komplexe der sE26re-Sonde. Auffällig ist das Auftreten von weiteren spezifischen Protein-DNA Interaktionen (D, D' und D'') nach Einzelstrangkompetition.

Überprüft man verschiedene Mutationen innerhalb des sE26re DNA-Fragments bezüglich der beschriebenen Protein-DNA Bindungen, so fällt auf, dass die jeweiligen Faktoren unterschiedliche DNA-Erkennungs-Regionen und/oder -Eigenschaften besitzen.

Die hier durchgeführte EMSA-Studie zeigt zumindest für Faktor B deutlich, dass die entsprechende DNA-Erkennungssequenz innerhalb der ersten 22 bp von sE26re lokalisiert sein muss, da fast alle gesetzten Mutationen, mit Ausnahme von mut5, eine Bindung dieses Proteins

verhindern (Abb. 2.12). Das Eingrenzen einer entsprechenden DNA-Sequenz für die Faktoren D, D' und D'' mit den eingesetzten Mutanten ist deutlich schwieriger. Die hier durchge-

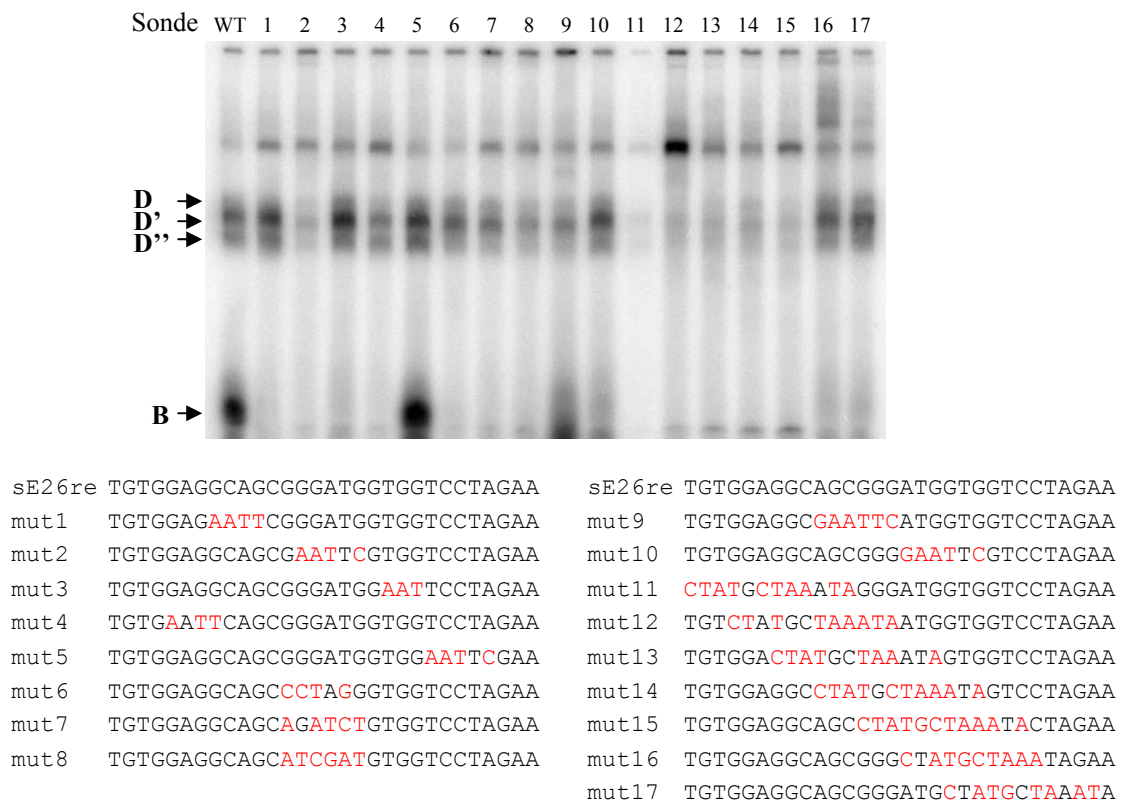


Abb. 2.12 Mutationsanalysen zur Einengung der spezifischen DNA-Erkennungsregion in HS3

Gezeigt sind die Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Mutationssonden mut1-mut17 (1-17) im Vergleich zu sE26re (Wildtyp, WT). Mutierte Sequenzabschnitte sind rot hervorgehoben. Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert, mit humanem MG63-Kernextrakt inkubiert und in einem 8 %igen, nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das EMSA-Autoradiogramm zeigt deutlich, dass außer mut5 (5) alle Mutanten Faktor B nicht mehr binden können. Die Bindung der Faktoren D, D' und D'' hingegen wird am stärksten durch die großflächigen Mutationen mut12-15 reduziert.

führte Mutationsanalyse deutet darauf hin, dass den Faktoren D-D'' ein komplexeres DNA-Bindungsverhalten zugrunde liegt, denn nahezu alle Mutationen zeigen noch mehr oder weniger starke Bindung. Am schwächsten sind die Signale bei den großflächigen Mutanten mut12-15 und der zentral gelegenen Mutation mut2. Eine gezielte Aussage über eine für die Bindung essentielle DNA-Sequenz bzw. deren Lokalisation innerhalb des sE26re DNA-Einzelstrangs, lässt sich anhand dieses Experiments für keinen dieser Faktoren treffen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Region HS3 mit ihren, zumindest *in vitro*, zahlreich assoziierten Proteinen die ursprünglichen Erwartungen bezüglich akzessorischer Faktoren erfüllt hat. Ob eines der DNA-bindenden Proteine tatsächlich auch *in vivo* regulatorische Einflüsse auf den IFN- β Promotor ausüben vermag, wird in Abschnitt 2.3

untersucht. Primär konzentrieren sich die folgenden Untersuchungen auf den DNA-Doppelstrang-spezifischen Faktor, der für die Bereiche HS1 und HS2 beschrieben worden ist, insbesondere auf dessen *in vivo* Beteiligung an der Regulation des IFN- β Promotors und eine möglicherweise spezieübergreifende Wirkungsweise.

2.2 Analogien zwischen der humanen und murinen IFNB1-Domäne

Ein Hauptbestandteil dieser Arbeit war die Verifizierung des SIDD-Algorithmus als potentielles Vorhersageprogramm für DNA-Bereiche mit regulatorischer Funktion am Beispiel des Kontrollbereichs der humanen IFNB1-Domäne. Darüber hinaus sollten SIDD-Profile auf Homologien, anhand von konservierten DNA-Bindungsstellen in Bereichen mit erhöhtem Destabilisierungspotential, spezieübergreifend untersucht werden (Mensch \rightarrow Maus). Hierfür wurden SIDD-Profile aus äquivalenten Kontrollbereichen der IFNB1-Domäne beider Organismen, deren IFN- β Regulation prinzipiell als vergleichbar gilt, zunächst hinsichtlich struktureller Gemeinsamkeiten bewertet und anschließend biochemisch mittels EMSA-Studie analysiert.

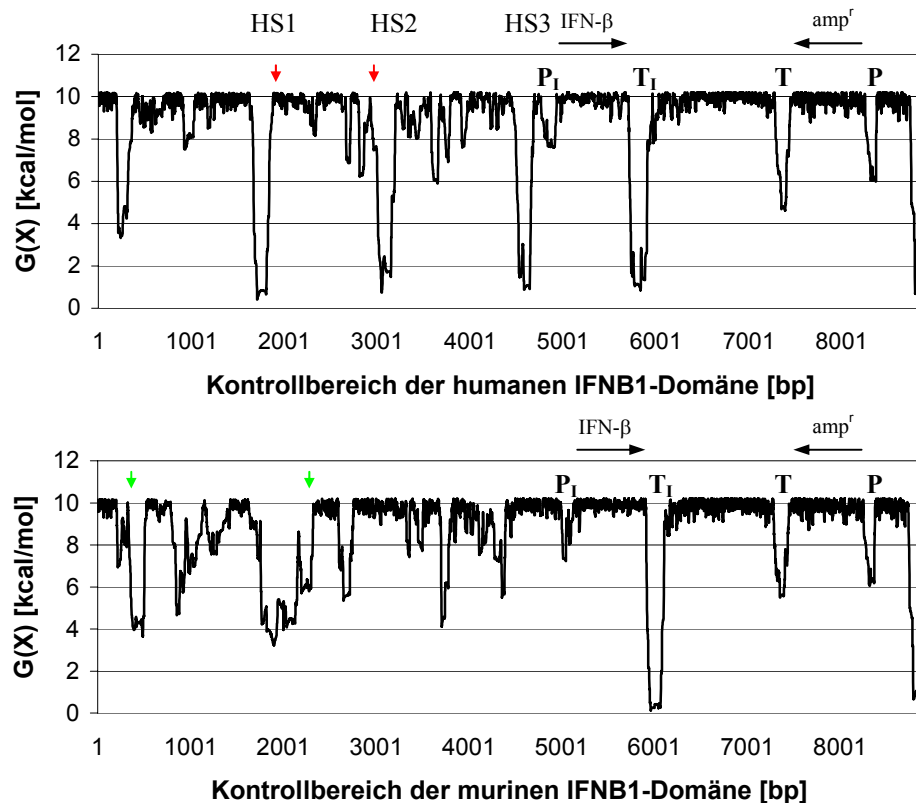


Abb. 2.13 Vergleich zwischen humanem und murinem SIDD-Profil

In der Abbildung sind die SIDD-Profile des humanen (oben) und murinen (unten) Kontrollbereichs der IFNB1-Domänen zum besseren Vergleich einander gegenüber gestellt. Die nahezu identischen Destabilisierungsmuster der Ampicillinen-assoziierten (amp^r) Promotor- (P) und Terminatorsignale (T) deuten auf einen vergleichbaren Grad der Gesamtdestabilisierung beider Kontrollbereiche hin (Kompetitionsprinzip). In beiden Sequenzen ist die Lage des IFN- β Gens inkl. Promotor- (P₁) und Terminatorsignal (T₁) eingetragen. Im humanen SIDD-Profil sind außerdem die drei dominant destabilisierten Bereiche HS1-HS3, sowie die Positionen der DNA-Doppelstrang-spezifischen HS1- und HS2-assoziierten Faktoren (rote Pfeile), dargestellt. Grüne Pfeile zeigen äquivalente DNA-Bindungsstellen bei der murinen Sequenz an.

Zunächst wurden für Mensch (Chromosom 9) und Maus (Chromosom 4) nahezu gleichgroße genomische DNA-Bereiche (ca. 6 kb) der jeweiligen IFN- β Domäne (5'-*upstream*-Bereich des Promotors plus IFN- β Gen (Promotor, kodierende Sequenz und Terminator)) aus den frei verfügbaren Genomsequenzierungsdatensätzen analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit des Strangtrennungspotentials (G(X)) wurden die zuvor ermittelten Sequenzen *in silico* in das Referenzplasmid pTZ18R kloniert, dessen Ampicillin-Resistenzgen (amp^r) als interner Destabilisierungsstandard dient. Die entsprechenden SIDD-Profile wurden daraufhin von Prashanth Ak (UC Davis Genome Center Davis, CA USA) kalkuliert (Abb. 2.13). Zur besseren Veranschaulichung wird der 5'-*upstream*-Bereich samt murinem IFN- β Gen in gleicher Ausrichtung dargestellt. Als einzige Gemeinsamkeit der zwei SIDD-Profile kann neben der starken Destabilisierung der Polyadenylierungsstelle (T) und dem deutlich schwächer destabilisierten Promotorbereich (P) des IFN- β Gens festgestellt werden, dass beide *upstream*-Kontrollbereiche global einen sehr ähnlichen Destabilisierungsgrad aufweisen. Aufschluss hierüber geben die nahezu identischen Destabilisierungsmuster der Ampicillingen-assoziierten Promotor- und Terminatorregionen, da die Berechnung der SIDD-Profile nicht nur auf den Bindungsenthalpien einzelner Basenpaare basiert, sondern auch den Einfluss benachbarter DNA-Sequenzen mit einbezieht (Kompetitionsprinzip). Im Detail gibt es jedoch Unterschiede. So zeigt die humane Kontrollregion die drei dominanten, sehr stark destabilisierten Bereiche HS1-HS3, wohingegen die murine Sequenz deutlich mehr und vor allem schwächere SIDD-Minima besitzt. Während letztere erst ~ 500 bp entfernt vom Promotor beginnen und dabei eine weniger auffällige Ordnung aufweisen, schließen sich die destabilisierten Bereiche der humanen Sequenz in nahezu gleichen Abständen nahtlos an den Promotor an.

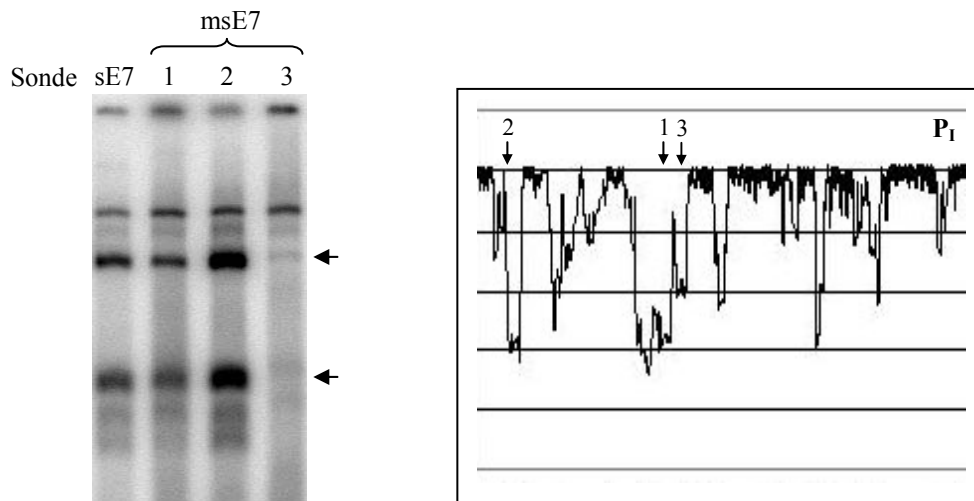


Abb. 2.14 Potentielle sE7-homologe Bindungsstellen im murinen IFN- β *upstream*-Bereich

Gezeigt ist ein analytischer EMSA zur Verifizierung muriner Sequenzen bezüglich sE7-ähnlichem Bindungsverhaltens. Getestet wurden drei verschiedene murine Kandidatensequenzen (msE7 1-3) im Vergleich zu der humanen Sonde sE7 (Reihe 1). Während msE7 1 und msE7 2 eine, zur sE7 Sonde, vergleichbare Bindungsaffinität für die beiden spezifischen Faktoren zeigen, so ist msE7 3 deutlich schwächer (schwarze Pfeile). Die Ausschnittsvergrößerung (vgl. Abb. 2.13) des SIDD-Profil der 5'-Region des murinen IFN- β Gens gibt die Positionen des Promotors und der drei Testsequenzen wieder, wobei letztere mit stark destabilisierten Regionen koinzidieren.

Abgesehen von diesen bioinformatischen Unterschieden zwischen humaner und muriner 5'-*upstream*-Region lässt sich anhand biochemischer Untersuchungen eine weitere Gemeinsamkeit finden. So konnten neben den spezifischen HS1- und HS2-assoziierten DNA-Protein Interaktionen (s. Abb. 2.1) der humanen Sequenz entsprechende DNA-Erkennungselemente auch im murinem *upstream*-Bereich, SIDD-Minima-assoziiert, gefunden werden. Abbildung 2.14 zeigt einen analytischen EMSA mit humanem MG63-Kernextrakt, der das humane sE7-Motiv mit DNA-Sequenzen der Maus vergleicht, welche alle ein 5'-ATGG-3' *core*-Motiv beinhalten (vgl. Abb. 2.4). Die murinen DNA-Fragmente msE7 1 und msE7 2 zeigen eine vergleichbar starke Assoziation der spezifischen Proteine wie das humane sE7-Fragment, wohingegen die Signale der msE7 3 Sonde deutlich schwächer sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz auffälliger Unterschiede zwischen den computergenerierten SIDD-Profilen von Mensch und Maus, durch das Auffinden von homologen DNA-Erkennungssequenzen, innerhalb von Regionen mit erhöhter Tendenz zur Einzelstrangtrennung, und in ähnlichen Abständen zum Promotor eine biochemische Gemeinsamkeit gefunden werden konnte. Ob hier ein auf molekularbiologischer Ebene konserviertes, speziesübergreifendes Regulationsprinzip der IFNB1-Domäne zugrunde liegt, konnte in dieser Arbeit aus Zeitmangel nur teilweise weiter untersucht werden (siehe Diskussion).

2.3 Einfluss des genomischen Kontrollbereiches auf die Regulation des humanen IFN- β Promotors

Alle bisher beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass *in vitro* mehrere Faktoren spezifisch an kurze, aus dem genomischen Kontext der IFNB1-Domäne entnommene DNA-Fragmente assoziieren können. Ob diese Interaktionen auch *in vivo* einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription auszuüben vermögen, wird im folgenden Abschnitt untersucht.

Hierzu wurden verschiedene Reportergenkonstrukte, bestehend aus unterschiedlich langen genomischen Bereichen der humanen IFN- β Region, generiert, wobei ein nachgeschaltetes *firefly*-Luciferasegen stets unter der Kontrolle eines 281 bp langen Fragments des humanen IFN- β Promotors steht. Ferner beinhalten alle Konstrukte das Neomycinphosphotransferase-Gen, welches nach erfolgter Transfektion in eukaryontische Zellen eine Positivselektion auf stabile genomische Integration erlaubt. Das Konstrukt pILGTkneo (Grundkonstrukt, P) enthält ausschließlich die oben beschriebene Promotorregion, während pILGTkneoEcoC (P + EcoC; Wildtyp) und mehrere unterschiedliche Mutanten zusätzlich durch den genomischen 5'-Kontrollbereich des humanen IFN- β Promotors (EcoC-Fragment; Mielke *et al.*, 1990) komplettiert werden. Letztere tragen zudem eine Reihe von verschiedenen Basensubstitutionen in den destabilisierten Regionen HS1, HS2 bzw. HS3 (Abb. 2.15). Die Konstrukte pILGTkneoEcoCMutsE7 (P + EcoCMutHS2) und pILGTkneoEcoCMutHS1 (P + EcoCMutHS1) stellen jeweils Einzelmutanten der unter 2.1 beschriebenen DNA-Bindungsstellen, für die spezifischen DNA-Doppelstrang-bindenden Faktoren der Regionen

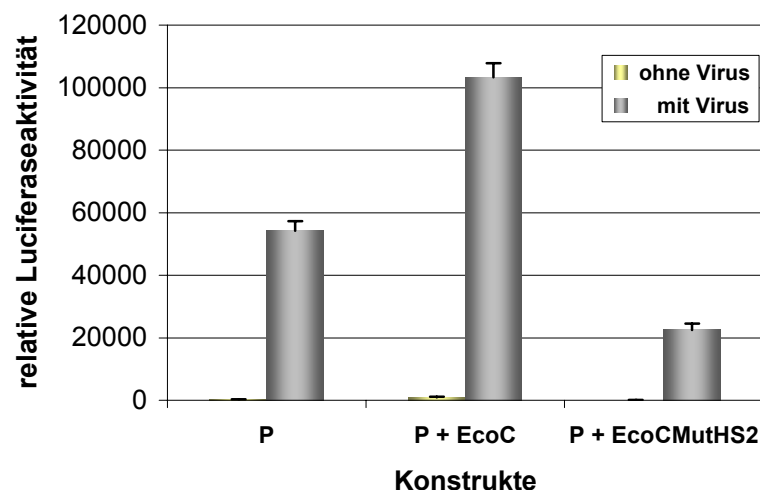


Abb. 2.16 Regulatorischer Einfluss des 5'-Kontrollbereichs auf den humanen IFN- β Promotor

Vergleich der Virus-induzierten Transgenexpression. Das Wildtyp-Konstrukt (P + EcoC) zeigt relativ zum Grundkonstrukt (P) etwa die doppelte Luciferaseaktivität. Dieser positive Effekt des Kontrollbereichs (EcoC-Fragment) auf die Induzierbarkeit des humanen IFN- β Promotors lässt sich durch eine Mutation im sE7-Motiv der HS2 (P + EcoCMutHS2) signifikant reduzieren.

Unterschiede, bezüglich der Induzierbarkeit (mit Virus), aufweisen (Abb. 2.16). So ist die relative Luciferaseaktivität des Grundkonstrukts um den Faktor 2 geringer, als beim Wildtyp-Konstrukt. Dieses Ergebnis unterstreicht den positiven Einfluss der genomischen 5'-*upstream*-Region auf die Induzierbarkeit des humanen IFN- β Promotors (vgl. D. Klehr, 1991; Klehr *et al.*, 1991). Noch auffälliger hingegen ist die 5-fach verminderte Luciferaseaktivität der Mutante P + EcoCMutHS2 im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Ergebnis legt eine entscheidende Rolle der sE7-assoziierten Faktoren an HS2 bei der Induktion des humanen IFN- β Promotors nahe. Dass die hier geschilderten Beobachtungen nicht auf unterschiedlich hohe Kopien-

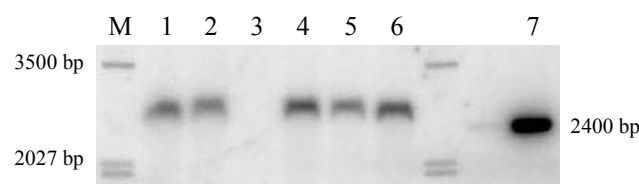


Abb. 2.17 Vergleich der Kopienzahlen der getesteten stabilen Klongemische

Die Abbildung zeigt eine quantitative *Southern Blot* Analyse von integrierten Kopien der in Abb. 2.16 getesteten stabilen Klongemische. Aufgetragen sind gleiche Mengen HMW-DNA von älteren (Reihe 1, P und Reihe 2, P + EcoC; Positivkontrollen) und den aktuellen Klongemischen (Reihe 4, P; Reihe 5, P + EcoC und Reihe 6, P + EcoCMutHS2). Als weitere Kontrollen dienen HMW-DNA von Wildtyp LM(Tk)-Zellen (Reihe 3) und Plasmid-DNA (Reihe 7). Die DNA-Sequenz des Luciferasegens wurde als Sonde eingesetzt. M: radioaktiv-markierter Größenstandard

zahlen der stabil integrierten Konstrukte beruhen, wurde mittels *Southern Blot* Analyse verifiziert. Alle stabilen Klongemische, die im Induktionsversuch (Abb. 2.16) getestet worden sind, weisen ähnliche Hybridisierungssignalintensitäten gegenüber der Luciferasegen-Sonde auf (Abb. 2.17, Reihe 4-6) auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Anzahl der stabil ins Genom integrierten Reporter-genkonstrukte aller drei Klongemische vergleichbar ist. Somit sind die beobachteten Induktionseffekte ausschließlich auf die Sequenzbeschaffenheit der einzelnen Konstrukte zurückzuführen. Die induktionsfördernde Bedeutung, die dabei den Faktoren zukommt, welche an das sE7-Motiv der Region HS2 binden können, ist hiermit bewiesen.

Hinsichtlich des signifikanten Einflusses einer geringen Modifizierung der DNA-Sequenz (P + EcoCMutHS2) des hier untersuchten genomischen Kontrollbereiches der IFNB1-Domäne, auf die Induzierbarkeit des IFN- β Promotors, wurden nachfolgend die drei verbliebenen Mutanten P + EcoCMutHS1, -MutHS1/HS2 und -MutHS3 anhand stabiler Klongemische untersucht. Als Kontrollen wurden zusätzlich die zuvor überprüften Reporter-genkonstrukte verwendet. Die graphische Darstellung in Abbildung 2.18 zeigt die, auf den Proteingehalt der einzelnen Zelllysate normierten, relativen Luciferaseaktivitäten der Klongemische vor und nach Virusinduktion. Verglichen mit den Kontrollen, welche obige Beobachtung eindeutig bestätigen (vgl. Abb. 2.16), zeigen sowohl die Einzelmutante P + EcoCMutHS1, als auch die Doppelmutante P + EcoCMutHS1/HS2 eine, dem Konstrukt

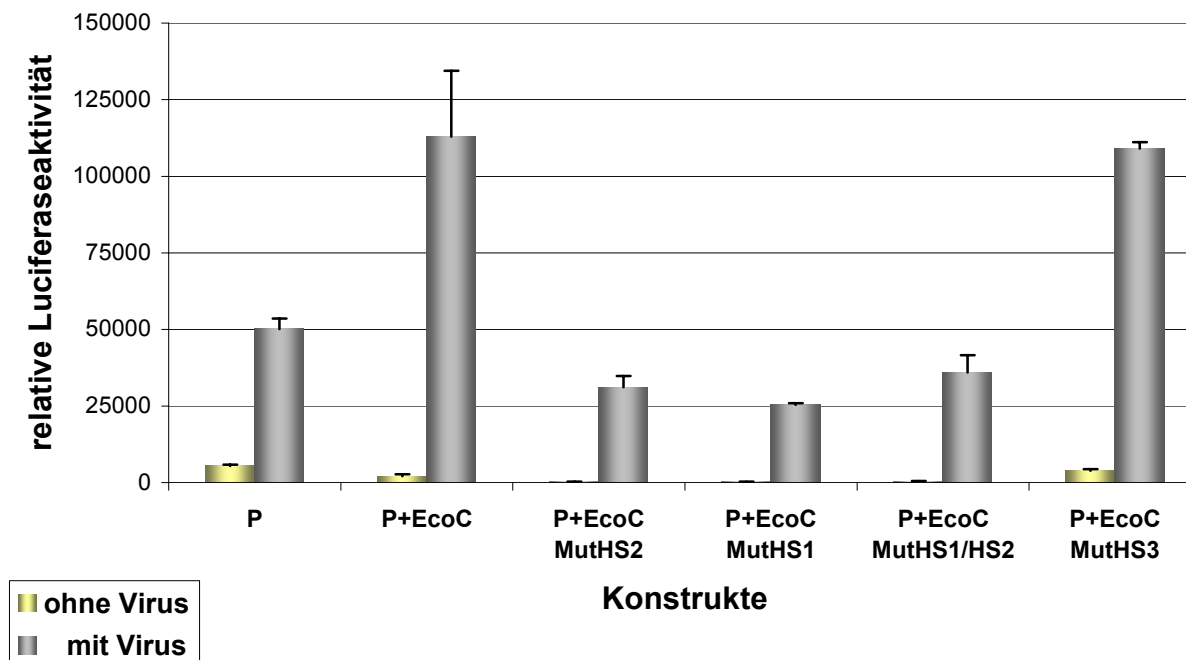


Abb. 2.18 Einfluss verschiedener Mutationen im Kontrollbereich auf die Regulation des humanen IFN- β Promotors

Das Diagramm verdeutlicht die Auswirkungen von Basensubstitutionen innerhalb des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kontrollbereiches der humanen IFNB1-Domäne vor (ohne Virus) und nach (mit Virus) Aktivierung des IFN- β Promotors. Dargestellt sind die relativen Luciferaseaktivitäten nach Normierung auf den Gesamtproteingehalt der untersuchten stabilen Klongemische verschiedener Transgenkonstrukte.

P + EcoCMutHS2 äquivalente, Reduktion der Reportergenaktivität. Das Induktionspotential nach Viruszugabe des P + EcoCMutHS3-Klongemisches gleicht der Wildtypkontrolle, wohingegen die Basalaktivität beinahe doppelt so hoch ist.

Die hier beschriebenen Beobachtungen der Mutationsstudie zeigen, dass neben dem HS2-assoziierten sE7-Motiv auch der sE7-homologen DNA-Bindungsstelle der Region HS1 eine Funktion bezüglich der IFN- β Promotor Aktivierung zukommt. Die Aufhebung der Faktor B-DNA Interaktion innerhalb des destabilisierten Bereichs HS3 hat hingegen keine Auswirkungen auf die Induzierbarkeit und Aktivität des humanen IFN- β Promotors zur Folge, bewirkt jedoch im nicht-induzierten Zustand eine leichte Erhöhung der Basalaktivität (De-repression).

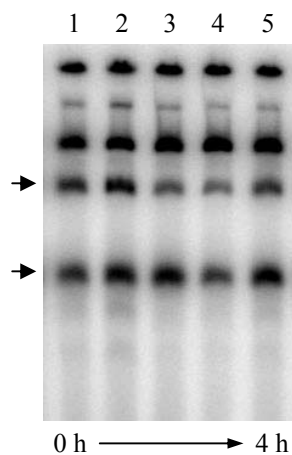


Abb. 2.19 Induktionszeitreihe nach NDV-Induktion

Das EMSA-Autoradiogramm zeigt die spezifischen *shifts* (schwarze Pfeile) der humanen sE7-Sonde vor (Reihe 1, 0 h) und 1-4 h nach Virusinduktion (Reihe 2-5). Aufgetragen sind jeweils gleiche Mengen Kernextrakt und radioaktiv-markierte Sonde zur Überprüfung von zellulären Einflüssen, wie Proteolyse oder Expressionsanstieg, auf den endogenen *pool* der sE7-spezifischen Proteine nach Virusinduktion.

Ob die spezifischen, mit den Bereichen HS1 und HS2 interagierenden Proteine während des Induktionsprozesses einer übergeordneten Regulation, wie Proteolyse oder einer erhöhten Expressionsrate, unterworfen sind, sollte abschließend eine Induktionszeitreihe NDV-induzierter Zellen zeigen. Der analytische EMSA in Abbildung 2.19 vergleicht Kernextrakte von induzierten humanen MG63-Zellen über einen Zeitraum von 4 Stunden mit dem nicht-induzierten Zustand (0 h, Reihe 1). Ein Vergleich zwischen den ersten beiden Reihen deutet einen leichten Anstieg der spezifischen Proteine im Kernextrakt 1 h (Reihe 2) nach der Induktion an, während 2 h (Reihe 3) und 3 h (Reihe 4) später zumindest die obere Bande schwächer wird. Nach 4 h steigt die Signalintensität des oberen *shifts* wieder an (Reihe 5). Eindeutige Schlüsse über proteolytische bzw. den Expressionslevel betreffende Ereignisse können aus diesem Experiment letztendlich nicht gezogen werden, da die Intensitätsunterschiede der Signale zu gering sind.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass der humane, aus dem genomischen Kontext herausgelöste IFN- β Promotor mittels Virusinduktion aktiviert werden kann (vgl. Maniatis *et al.*, 1992), jedoch zur Verstärkung des Induktionspotentials, wie nach Klehr *et al.*, 1991 zu erwarten, weiter *upstream* gelegener DNA-Bereiche bedarf. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den kurzen, jeweils das sE7 *core*-Motiv beinhaltenden, DNA-Sequenzen der destabilisierten Bereiche HS1 und HS2 zu. Die HS3-Faktor B Interaktion

hingegen scheint an der Aufrechterhaltung des inaktiven Status des humanen IFN- β Promotors beteiligt zu sein. Der folgende Abschnitt widmet sich der Bestimmung und näheren Charakterisierung der hier beteiligten Proteine.

2.4 Identifizierung der spezifischen DNA-bindenden Proteine

Trotz zahlreicher alternativer Methoden, wie verschiedene DNA-Affinitätschromatographien über nicht-spezifische (Alberts *et al.*, 1968), bzw. spezifische (Gadgil *et al.*, 2001), Einzel- (Gilham, 1964 und 1974), oder Doppelstrang DNA-Affinitätssäulen (Briggs *et al.*, 1986; Rosenfeld und Kelly, 1986; Arndt-Jovin *et al.*, 1975) und moderner Anwendungen, wie dem Biotin/Streptavidin-Affinitätssystem (Gabrielsen *et al.*, 1989), der Heparin-Sepharose Chromatographie (Gadgil und Jarrett, 1999) bzw. Heparinsäulen-Fraktionierung (Zhang *et al.*, 1991), dem *Yeast One-Hybrid Trap* (Firma Clontech) und zahlreicher weiterer Methoden, ist die Identifizierung von DNA-bindenden Proteinen immer noch ein sehr aufwändiges Unterfangen. Grund dafür ist, dass es sich bei den meisten DNA-bindenden Proteinen um Transkriptionsfaktoren handelt, welche, verglichen mit *housekeeping* Proteinen, in sehr geringen Kopienzahlen in der Zelle vorkommen. Die größte Schwierigkeit besteht in der Regel darin, das entsprechende Protein aus der Vielzahl zellulärer Proteine zu isolieren und in ausreichender Menge für nachfolgende Bestimmungsverfahren, wie Massenspektroskopie oder N-terminale Sequenzierung, anzureichern. Erhebliche Vereinfachungen bieten unter Umständen Datenbankrecherchen. Die gegenwärtig am häufigsten genutzte Transkriptionsfaktor-Datenbank ist TRANSFAC (Wingender *et al.*, 1996), welche einen großen Katalog an experimentell verifizierten Transkriptionsfaktoren und deren DNA-Erkennungssequenzen beinhaltet. Zahlreiche weitere Sequenzanalyse-Programme nutzen die TRANSFAC-Ressourcen zur Identifizierung potentieller DNA-Bindungsstellen (TESS-Master, EPD, MatInspector etc.). Kontinuierliche *updates* sollen die Qualität der Datenbank aufrechterhalten, doch die Fülle an Neuveröffentlichungen und noch nicht eingetragene ältere Publikationen lassen immer wieder Lücken entstehen. Ein weiteres Problem der Suchergebnisse ist die meist extrem hohe Anzahl an falsch-positiven Kandidaten. Grund hierfür ist die kurze, oft nur 6-10 bp umfassende, vielfach degenerierte Natur von Transkriptionsfaktor-Erkennungssequenzen (Pennacchio und Rubin, 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, welche zur Identifizierung der unter 2.1 beschriebenen spezifischen DNA-bindenden Faktoren geführt haben, werden im Folgenden beschrieben.

2.4.1 Identifizierung der sE7-assoziierten Faktoren

Zunächst konzentrierten sich die Bemühungen zur Identifizierung der bisher charakterisierten spezifisch DNA-bindenden Proteine auf das sE7-Motiv aus der destabilisierten Region HS2 (vgl. Abb. 2.1 und 2.3), da für die hier beteiligten Faktoren erste *in vivo* Einflüsse auf den humanen IFN- β Promotor beobachtet werden konnten (vgl. Abb. 2.16). Datenbankrecherchen mit der sE7 DNA-Sequenz als Vorlage führten unter Zuhilfenahme der TESS-Master Suchmaschine, zu einem hundertprozentigem Treffer für den 1987 von Kakkis und Calame

beschriebenen Transkriptionsfaktor CF1 (*common factor 1*). Als identische DNA-Erkennungssequenz wurde die Basenabfolge 5'-AAATGG-3' ermittelt, welche mit der unter 2.1.1 experimentell verifizierten Bindungsstelle komplett übereinstimmt. Nachfolgende Unter-

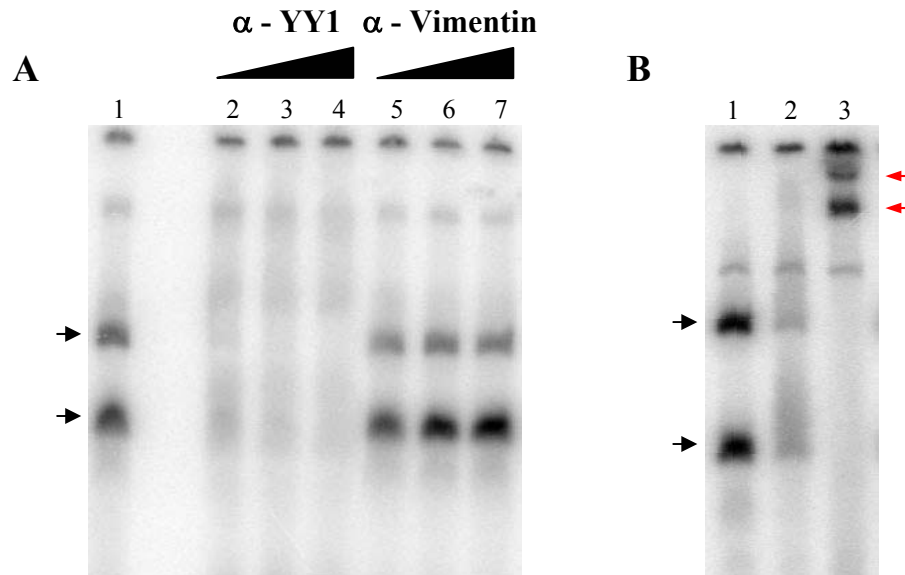


Abb. 2.20 EMSA-supershift Analysen der spezifischen sE7-assoziierten Proteine aus humanem MG63-Kernextrakt

A) Standardreaktionsansätze für einen sE7-EMSA wurden mit steigenden Mengen (0,2, 1 und 2 µg) anti-YY1 (Reihe 2-4) bzw. anti-Vimentin (Reihe 5-7) Antikörper versetzt und mit einem sE7-EMSA ohne Antikörper (Positivkontrolle, Reihe 1) verglichen. Der anti-YY1 Antikörper interferiert im Gegensatz zum anti-Vimentin Antikörper, eindeutig mit der Formierung der beiden Protein-DNA Komplexe (*blocking*) und suggeriert somit eine Beteiligung des Faktors YY1 an der Komplexbildung. **B)** Verschiedene anti-YY1 Antikörper können unterschiedliche *supershift* Phänotypen erzeugen. Während 1 µg des Antikörpers sc-C20 (Reihe 2) das zuvor beschriebene *blocking* ergibt, zeigt sc-1703 einen klassischen *supershift* (Reihe 3, rote Pfeile). Schwarze Pfeile markieren die beiden spezifischen Protein-DNA Komplexe der sE7-Sonde.

suchungen zum Faktor CF1 ergaben, dass es sich hierbei um den ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor Yin Yang 1 (YY1) handelt. Namensgebend für das 65 kDa große Protein YY1 (UCRBP Transkriptionsfaktor, delta Faktor oder NF-E1), welches zur Familie der GLI-Krüppel Zinkfinger Transkriptionsfaktoren gehört, ist die Eigenschaft, dass es je nach Kontext sowohl transkriptionell aktivierend als auch reprimierend wirken kann (Thomas und Seto, 1999), ein Faktum, welches nicht ganz unerheblich für die bereits unter 2.3 gezeigten Einflüsse auf die Induzierbarkeit des humanen IFN-β Promotors, sein kann. Die nachfolgenden Experimente widmen sich daher der Fragestellung, ob es sich bei einem der sE7-assoziierten Faktoren wirklich um diesen außergewöhnlichen Transkriptionsfaktor handelt.

Zu diesem Zweck wurde ein Antikörper, welcher nativ gefaltetes humanes YY1 erkennen kann, in EMSA-*supershift* Experimenten auf Bindung an die sE7-assoziierten Proteine getestet. Erste Versuche resultierten in einer Dissoziation beider sE7-spezifischen

Protein-DNA Komplexe nach Zugabe des anti-YY1 Antikörpers zum EMSA-Reaktionsansatz (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung YY1-spezifisch ist, wurden EMSA-Reaktionsansätze entweder mit anti-YY1 oder anti-Vimentin (Negativkontrolle) inkubiert und die Autoradiogramme anschließend miteinander verglichen. Während Zugabe unterschiedlicher Mengen anti-YY1 Antikörper (0.2-2 µg) in allen Fällen ein Verschwinden (*blocking*) der zwei sE7-spezifischen *shifts* zur Folge hat, bleiben beide Protein-DNA Komplexe in Gegenwart von entsprechenden Konzentrationen anti-Vimentin Antikörper unbeeinflusst (Abb. 2.20A). Bestätigt wird diese Beobachtung durch eine weitere EMSA-*supershift* Analyse unter Verwendung eines zweiten, natives YY1-bindenden Antikörpers, welcher anstelle des zuvor beschriebenen *blockings* (Abb. 2.20B, Reihe 2) einen klassischen *supershift* (rote Pfeilspitze, Abb. 2.20B, Reihe 3) bewirkt. Somit scheint es sich bei beiden sE7-*shifts* entweder um verschiedene YY1-vermittelte DNA-Protein Komplexe oder, wie bei Gordon *et al.*, 2003 beschrieben, um *full length* YY1 (obere Bande) und ein C-terminales, die Zinkfingerdomäne beinhaltendes proteolytisches YY1-Fragment (untere Bande), zu handeln.

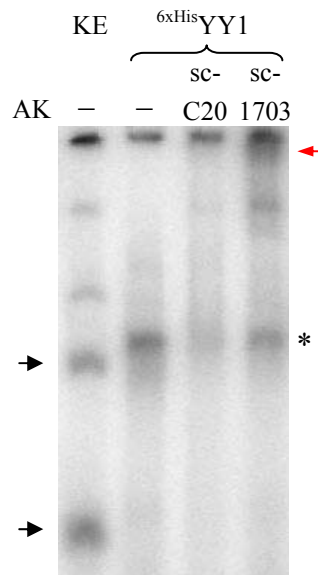


Abb. 2.21 Rekombinant hergestelltes humanes YY1 bindet an die sE7 DNA-Sequenz

Die sE7-Sonde weist bei EMSA-Studien mit humanem MG63-Kernextrakt (KE) zwei spezifische Protein-DNA Komplexe auf (schwarze Pfeile, Reihe 1). Inkubiert man die sE7-Sonde mit rekombinant in *E. coli* hergestelltem, humanen YY1, so resultiert daraus ausschließlich ein charakteristischer Komplex (schwarzes Sternchen, Reihe 2). Die YY1-sE7 Interaktion kann durch Zugabe von 1 µg anti-YY1 Antikörper (AK) entweder spezifisch geblockt (Reihe 3, plus sc-C20) oder teilweise retardiert (Reihe4, plus sc-1703) werden. Der *supershift* ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. Das leicht versetzte Laufverhalten zwischen dem oberen *shift* des Kernextrakts und dem gereinigten YY1-Protein resultiert aus einem 6-fach Histidin-Fusionsanteil.

Schließlich unterstreicht eine EMSA-Analyse mit rekombinant hergestelltem humanen YY1 (SantaCruz, sc-4125) die Wahrscheinlichkeit, dass es sich beim oberen der beiden sE7-spezifischen Protein-*shifts* um einen Komplex aus sE7 DNA-Sonde und *full length* YY1 handelt (Abb. 2.21). Dass das rekombinante Protein aus *E. coli*, verglichen mit dem endogenen

YY1 aus humanen MG63-Kernextrakten, im EMSA eine verminderte Mobilität aufweist, liegt an einem N-terminal fusionierten 6-fach Histidin-tag (Riquet *et al.*, 2001).

Beide Untersuchungen beweisen eine Interaktion von YY1 mit der doppelsträngigen sE7 DNA-Sonde und implizieren anhand der Beobachtungen unter 2.3 erstmals eine Beteiligung von YY1 an der Regulation des humanen IFN- β Promotors. Ein regulatorisches Potential von YY1 auf den humanen IFN- β Promotor wurde bereits 2003 von Weill und Mitarbeitern (Weill *et al.*, 2003) diskutiert (siehe Diskussion).

Im April 2004 wurde die Familie der GLI-Krüppel Zinkfinger Transkriptionsfaktoren um ein weiteres Mitglied ergänzt. Die Arbeitsgruppe um Edward Seto (Tempa, USA) identifizierte in humanen HeLa-Zellen ein zu 56,2 % YY1-homologes Protein, mit vergleichbarer DNA-Spezifität und publizierte dieses unter der Bezeichnung YY2 (Nguyen *et al.*, 2004). Aufgrund einer hoch konservierten DNA-Bindungsdomäne (86,4 % Identität) und einer fast identischen DNA-Erkennungssequenz von YY1 und YY2 wurde in nachfolgenden Experimenten das sE7-Motiv bezüglich einer YY2-Interaktion untersucht.

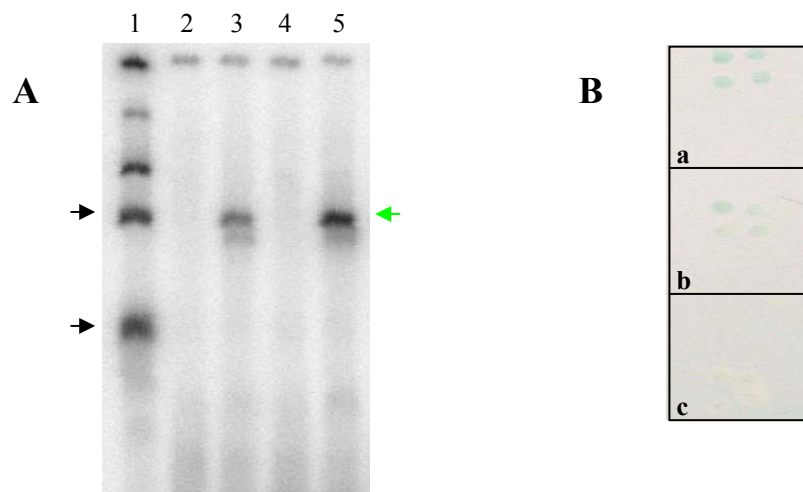


Abb. 2.22 Interaktion von YY2 mit der sE7 DNA-Sequenz

Die DNA-Bindung von YY2 an das DNA-Fragment sE7 wurde über EMSA- und *Yeast One-Hybrid*-Experimente verifiziert. **A)** Humaner MG63-Kernextrakt und die *in vitro* translatierten Proteine FLAGYY2 und Luciferase (Negativkontrolle) wurden parallel im EMSA auf Bindung an die sE7 DNA-Sequenz hin untersucht. Verglichen mit dem Kernextrakt (Reihe 1) zeigt nur FLAGYY2 (5 μ l (Reihe 3) bzw. 10 μ l Translationsansatz (Reihe 5)) spezifische Protein-DNA Komplexe. Entsprechende Volumina des Luciferase-Translationsansatzes weisen hingegen keine Signale auf (Reihe 2 und 4). Das FLAGYY2 Protein (grüner Pfeil) läuft exakt auf der gleichen Höhe, wie der obere Kernextrakt-spezifische *shift* (obere schwarze Pfeil). **B)** Stabil mit dem sE7 DNA-Fragment transformierte Hefezellen wurden im *Yeast One-Hybrid* System auf YY1 bzw. YY2 DNA-Bindung hin untersucht. Nach transients Transformation mit pGAD424YY2 (a), pGAD424YY1 (b) und pGAD424 (Negativkontrolle, c) wurden die Hefen einem *lift filter assay* unterzogen. Im Falle des YY1 und YY2 deutet die signifikante β -Galaktosidase-vermittelte Blaufärbung der vier Einzelklone, verglichen mit der Negativkontrolle, auf eine erfolgreiche YY1 bzw. YY2-sE7 Interaktion hin.

In Reticulozytenlysat *in vitro* translatiertes YY2 (Fusionsprotein mit N-terminalem FLAG-tag) wurde zunächst mittels EMSA-Studien auf die Bindung an das sE7 DNA-Fragment hin überprüft. Dabei zeigt YY2, im Gegensatz zu *in vitro* translaterter Luciferase (Negativkontrolle, Abb. 2.22A, Reihe 2 und 4), eine moderate Assoziation an die doppelsträngige sE7-Sonde (Reihe 3 und 5). Auffälligerweise läuft der sE7-YY2 Komplex, vergleichbar zu rekombinantem humanen YY1 (vgl. Abb. 2.21), exakt auf der gleichen Höhe, wie der obere sE7-spezifische *shift* aus humanem MG63-Kernextrakt (Abb. 2.22A, Reihe 1). Anschließende *Yeast One-Hybrid* Analysen auf YY1- bzw. YY2-Interaktion mit dem sE7-Motiv, bestätigen, dass entsprechend in Hefe exprimierte Proteine, durch Bindung an eine Promotor-nahe, stabil in das Hefegenom integrierte sE7 DNA-Erkennungssequenz, ein 3'-nachgeschaltetes *LacZ* Gen (β -Galaktosidase) aktivieren können. Die Aktivität des Reporter-gen-produkts wird dabei durch einen X-Gal Substratumsatz in einem so genannten *lift filter assay* visualisiert (Abb. 2.22B, a-c). Im Gegensatz zu der Negativkontrolle, in der die Hefezellen weiß bleiben, zeigt sowohl YY1 als auch YY2, durch Blaufärbung der Hefezellen, eine DNA-Wechselwirkung.

Somit besitzt neben YY1 auch YY2 die Fähigkeit, spezifisch mit der sE7 DNA-Sequenz aus der Region HS2 zu interagieren. Ob beide Proteine dabei antagonistisch bei der Regulation der Transkription des humanen IFN- β Gens beteiligt sind oder ob nur eines von beiden funktionell involviert ist, wird in Abschnitt 2.5 näher untersucht. YY1 bzw. YY2 sind nicht die einzigen Transkriptionsfaktoren, die spezifisch mit der doppelsträngigen sE7 DNA-Sequenz interagieren können. Hinweise hierfür ließen sich im Rahmen eines betreuten Teilprojekts (Stellamanns, 2005) finden. So wurde für das sE7 DNA-Fragment eine degenerierte Oct-1 (*Octamer-binding protein 1*) Bindungsstelle postuliert (siehe Abb. 2.4.2), welche mit dem YY1 bzw. YY2 *core*-Motiv teilweise überlappt (grüner Bereich, Abb. 2.23D). Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor mit einem breiten Wirkungsspektrum, welcher sowohl transkriptionell aktivierende als auch reprimierende Funktionen wahrnehmen kann (Kim *et al.*, 1996). Als essentielles DNA-Motiv dient ein stark variierendes Oktamer-Element mit der ursprünglich beschriebenen Konsensus-Abfolge 5'-ATTTGCAT-3' (Verrijzer *et al.*, 1992). Zur Verifizierung einer DNA-Bindung dieses Proteins mit der sE7 DNA-Sequenz wurden entsprechend systematische EMSA-*supershift* Experimente mit geeigneten Kernextrakten aus humanen MG63-Zellen, unter Verwendung *supershift*-kompetenter anti-Oct-1 Antikörper, durchgeführt. Neben der sE7-Sonde wurden zusätzlich die Mutante M4 (vgl. Abb. 2.4, YY1/YY2 Negativkontrolle) und DNA-Fragmente aus dem murinen (P^{mu}) bzw. dem humanen (P^{hu}) IFN- β Promotor bezüglich einer Oct-1-Assoziation überprüft, da für letzteren ebenfalls ein entsprechendes Oktamer-Element vorhergesagt werden konnte (Stellamanns, 2005). Das Autoradiogramm in Abbildung 2.23A zeigt nach Zugabe des anti-Oct-1 Antikörpers (Reihe 2) einen deutlichen *supershift* (rote Pfeilspitze), im Vergleich zu einem EMSA-Ansatz ohne entsprechenden Antikörper (Reihe 1), für die sE7-Sonde. Die Interaktion mit YY1/YY2 (schwarze Pfeile) bleibt dabei gänzlich unbeeinflusst. Darüber hinaus weisen auch die DNA-Sonden M4 und P^{hu} Oct-1 *supershifts* auf (rote Pfeilspitzen in den Reihen 4 und 6), während die murine IFN- β Promotorsequenz

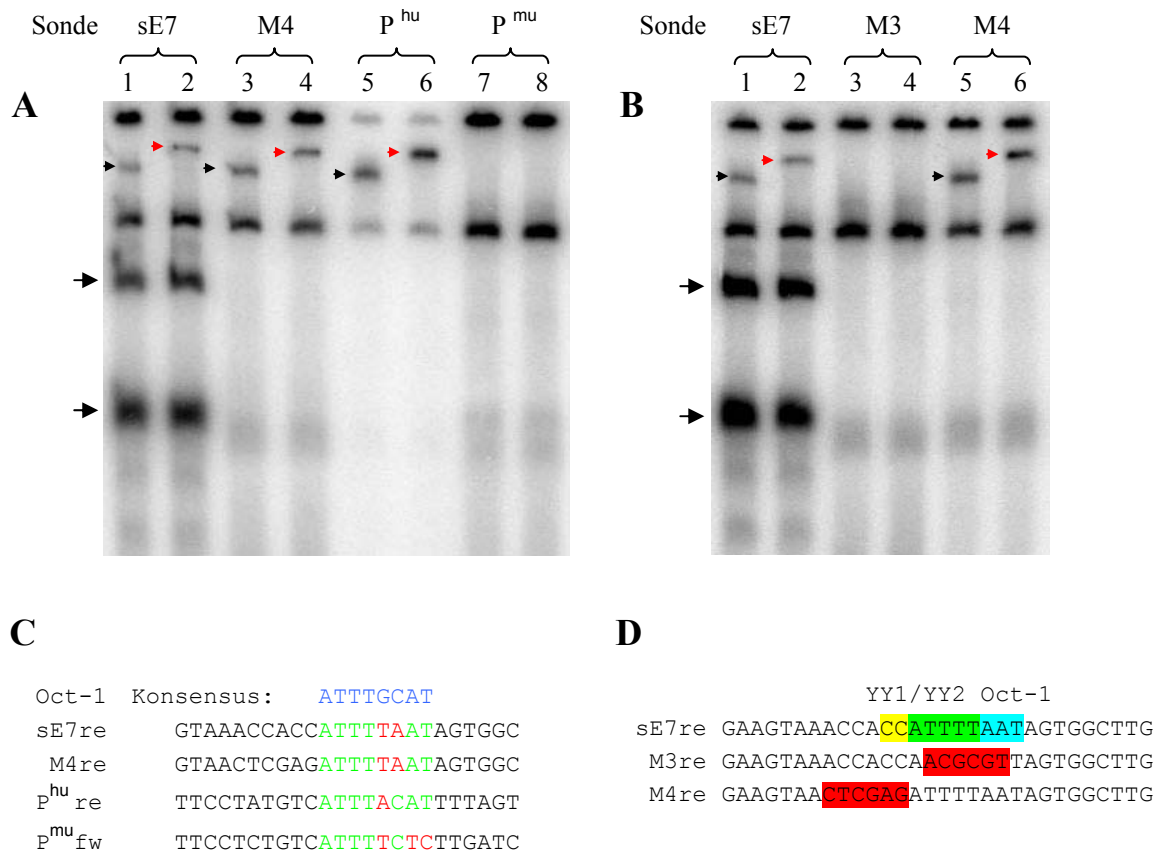


Abb. 2.23 Verifizierung von potentiellen Oct-1 DNA-Bindungsstellen in der humanen HS2-Region und dem Promotorbereich des IFN- β Gens von Mensch und Maus

Die DNA-Bindung der Oct-1 Kandidatensequenzen wurde mittels EMSA-*supershift* Analysen überprüft. **A)** Das dargestellte Autoradiogramm zeigt einen EMSA mit 30-mer Sonden der humanen DNA-Fragmente sE7, M4 und P^{hu}, sowie aus dem murinen Promotorbereich P^{mu}, in Abwesenheit (Reihe 1, 3, 5 und 7) bzw. in Gegenwart (Reihe 2, 4, 6 und 8) von anti-Oct-1 Antikörper und humanem MG63-Kernextrakt. Der EMSA zeigt, dass die Sonden sE7, M4 und P^{hu} im Gegensatz zu der murinen Sequenz P^{mu} mit Oct-1 interagieren können (schwarze Pfeilspitzen), da bei Anwesenheit des anti-Oct-1 Antikörpers spezifische *supershifts* (rote Pfeilspitzen) zu beobachten sind. Schwarze Pfeile zeigen YY1/YY2 spezifische Protein-DNA Komplexe. **B)** Mutationsanalyse zur Einengung der sE7-assoziierten Oct-1 DNA-Bindungsstelle. Die Sonden sE7, M3 und M4 wurden mittels EMSA-*supershift* Analyse mit (Reihe 2, 4 und 6) und ohne (Reihe 1, 3 und 5) anti-Oct-1 Antikörperzugabe auf Oct-1 Bindung in humanem MG63-Kernextrakt überprüft. Es ist deutlich zu erkennen, dass die sE7-Mutante M3 keine Oct-1 Bindung mehr vermitteln kann. **C)** Auflistung der degenerierten Oct-1 DNA-Erkennungssequenzen, der unter A) getesteten Sonden im Vergleich zum Oct-1 Konsensus-Motiv. Übereinstimmungen sind grün und Misspaarungen rot markiert. **D)** Vergleich der unter B) als Sonden eingesetzten DNA-Sequenzen. Rot markierte Bereiche heben die Mutationen im Vergleich zum sE7-Wildtyp hervor. Der überlappende Bereich vom YY1/YY2 (gelb) und Oct-1 (blau) DNA-Motiv ist grün dargestellt.

keine Bindung von Oct-1 zu vermitteln vermag. Alle drei zuletzt erwähnten Sonden können ferner nicht mit endogenem YY1/YY2 aus humanen Kernextrakten interagieren.

Ein Sequenzvergleich der getesteten DNA-Fragmente (Abb. 2.23C) hebt die für eine Oct-1-Bindung relevanten Basen der Sonden sE7, M4 und P^{hu} (grün gefärbt) hervor. Um die Signifikanz der markierten Basenpaare der sE7-Sonde auf eine Interaktion mit Oct-1 zu

überprüfen, wurde die Sonde M3 (vgl. Abb. 2.4), welche keine Oct-1-Assoziation vermitteln sollte, einem EMSA-Test unterzogen (Abb. 2.23D). Anders als die beiden Sonden sE7 und M4 weist M3 keine Oct-1-Bindung mehr auf und bestätigt somit die Funktionalität des degenerierten Oktamer-Elements der sE7 DNA-Sequenz.

Zusammengefasst zeigen die Versuche zur Oct-1 Interaktion, dass die sE7 DNA-Sequenz neben YY1 bzw. YY2 auch mit dem Oktamer-bindenden Protein 1 wechselwirken kann, wobei die jeweils relevanten DNA-Erkennungssequenzen einander überlappen (grüner Bereich, Abb. 2.23D). Damit kann eine gleichzeitige Bindung beider Proteine nahezu ausgeschlossen werden kann. Ob dennoch ein kooperatives Binden von YY1/YY2 und Oct-1 möglich ist, wurde bisher nicht überprüft. Neben dem funktionellen Oktamer-Element der sE7-Region wurde hier erstmals eine Oct-1-Bindungsstelle für den humanen IFN- β Promotor identifiziert, welche aber nicht auf den entsprechenden murinen Bereich übertragen werden konnte. Versuchsreihen zur Überprüfung einer regulatorischen Funktion der beiden beschriebenen Oct-1 DNA-Erkennungssequenzen beim IFN- β *silencing* bzw. dessen Induktionsmechanismus sind im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden.

2.4.2 Identifizierung der HS1- und HS3-assozierten Faktoren

Die doppelsträngige DNA-Sonde EMSA0c zeigt als einziges DNA-Fragment aus der destabilisierten Region HS1 eine spezifische Interaktion mit nukleären Proteinen aus humanen MG63 Zellen (vgl. Abb. 2.6A). Das identische *band-shift* Muster von sE7 und EMSA0c und die hohe Sequenzhomologie beider Sonden bezüglich des sE7 *core*-Motives (Abb. 2.6B), weisen auf einen vergleichbaren Proteinbesatz beider DNA-Fragmente hin. Somit gilt, wie zuvor unter 2.4.1 beschrieben, dass es sich bei den spezifisch DNA-bindenden Proteinen um YY1/YY2-DNA Komplexe handelt. Neben der HS2-assozierten YY1/YY2 Bindungsstelle konnte hiermit eine zweite, ebenfalls mit einer destabilisierten Region (HS1) korrelierende, YY1/YY2 DNA-Erkennungssequenz in der humanen IFNB1-Domäne lokalisiert und identifiziert werden.

Die akzessorischen Proteine der dritten destabilisierten Region HS3 wiesen ein komplett anderes EMSA-Muster auf als für die entsprechenden Bereiche von HS1 und HS2 beschrieben (vgl. Abb. 2.6B mit Abb. 2.8 und 2.10). Während die nähere Charakterisierung und anschließende Identifizierung der *shifts* A, A' und C-C'' (siehe Abb. 2.9) unter Anleitung im Rahmen einer Diplomarbeit (Stellamanns, 2005) durchgeführt wurde, konzentrierten sich die Bemühungen dieser Arbeit auf die DNA-Protein Komplexe B und D-D'' der Sonde sE26re (vgl. Abb. 2.11B). Für die Identifizierung der sE26re-assozierten Proteine wurden, wie zuvor für das sE7-Motiv beschrieben (2.4.1), zunächst auch Datenbankrecherchen, unter Zuhilfenahme der TESS-Master Suchmaschine, durchgeführt. Jedoch besaß keiner der Proteinkandidaten eine publizierte Sequenzspezifität für Einzelstrang DNA. Erst Vergleichsstudien von Publikationen des NCBI-server (Pubmed) erbrachten erste Hinweise auf mögliche Faktoren. Die meistversprechenden Treffer beschränkten sich auf Mitglieder der Einzelstrang-bindenden PUR (*purin-rich element binding protein*) Proteinfamilie (Gallia *et al.*, 2000). Die

bekanntesten und am besten charakterisierten Mitglieder dieser Proteinfamilie sind PUR α und PUR β , welche als Monomere bzw. Hetero- oder Homodimere sequenzspezifisch GGN-Motive

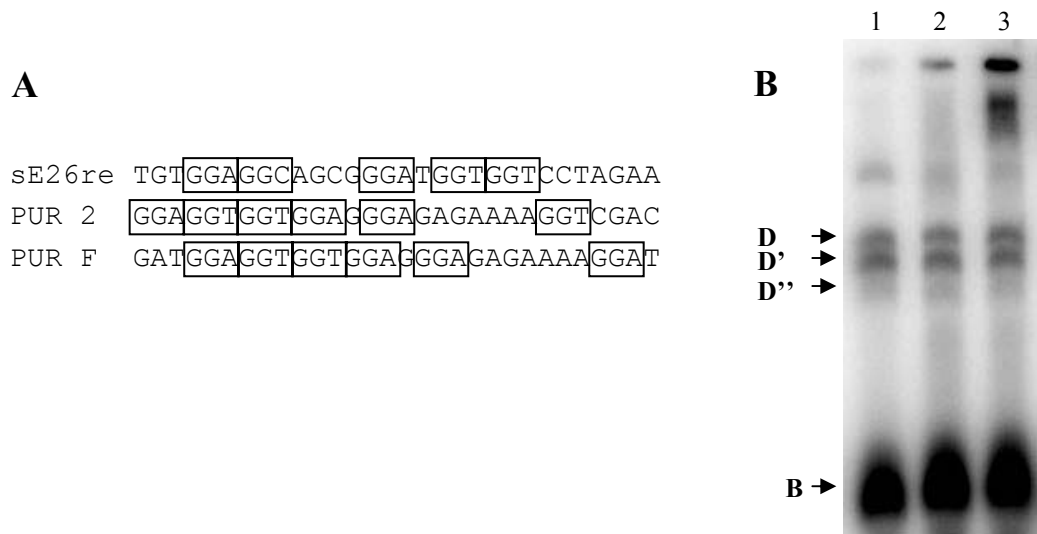


Abb. 2.24 Vergleich des sE26re DNA-Einzelstrangs mit verschiedenen PUR α / β -spezifischen DNA-Sonden

A) Die Abbildung zeigt die hohe Sequenzhomologie von sE26re in Bezug auf das PUR α / β -spezifische DNA-Erkennungselement GGN, verglichen mit den PUR α / β bindenden Sonden PUR 2 und F. **B)** Die Abbildung gibt einen EMSA der DNA-Einzelstränge sE26re (1), PUR 2 (2) und PUR F (3) in Gegenwart von humanem MG63-Kernextrakt wieder. Alle Sonden weisen die sE26re-typischen Protein-DNA Komplexe der Faktoren D-D'' und B auf (vgl. Abb. 2.11).

(N entspricht A, T oder C) auf einzelsträngiger DNA und RNA binden (Gallia *et al.*, 2000; Kelm *et al.*, 1999b). Derartige DNA-Erkennungsmotive lassen sich auch in fünffacher Wiederholung auf dem sE26re-Einzelstrang (Abb. 2.24A) finden. Vergleichende EMSA-Untersuchungen von sE26re mit beschriebenen PUR α / β DNA-Erkennungssequenzen, wie PUR 2 (MF0677; Bergemann und Johnson, 1992) und PUR F (Kelm *et al.*, 1997) offenbaren, dass alle drei Sonden nahezu identische Muster von DNA-Protein Komplexen zeigen (Abb. 2.24B). Dieser Befund deutet darauf hin, dass PUR α / β Hetero- bzw. Homodimere an der Entstehung des Bandenmusters der sE26re-Sonde beteiligt sind. Um eindeutig zu klären, welche DNA-Protein Komplexe PUR α bzw. PUR β beinhalten, wurden EMSA-*supershift* Experimente mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt (Abb. 2.25). Zum besseren Vergleich wurden die DNA-Sequenzen von sE26re (Sonde A) und PUR 2 (Sonde B, Positivkontrolle) nebeneinander aufgetragen. Interessanterweise zeigen sowohl die Reihen 5 und 6 (plus anti-PUR α Antikörper) als auch die Reihen 7 und 8 (plus anti-PUR β Antikörper), verglichen mit Standard EMSA-Ansätzen (Reihe 3 und 4), deutliche Anzeichen für *supershifts*. Während die Zugabe von anti-PUR α Antikörper in einer Retardierung des spezifischen Faktor D *shifts* beider Sonden resultiert (rote Pfeilspitze, Reihe 5 und 6), zeigen die Protein-DNA Komplexe der Faktoren D' und D'' nur in Gegenwart von anti-PUR β Antikörper für beide DNA-Einzel-

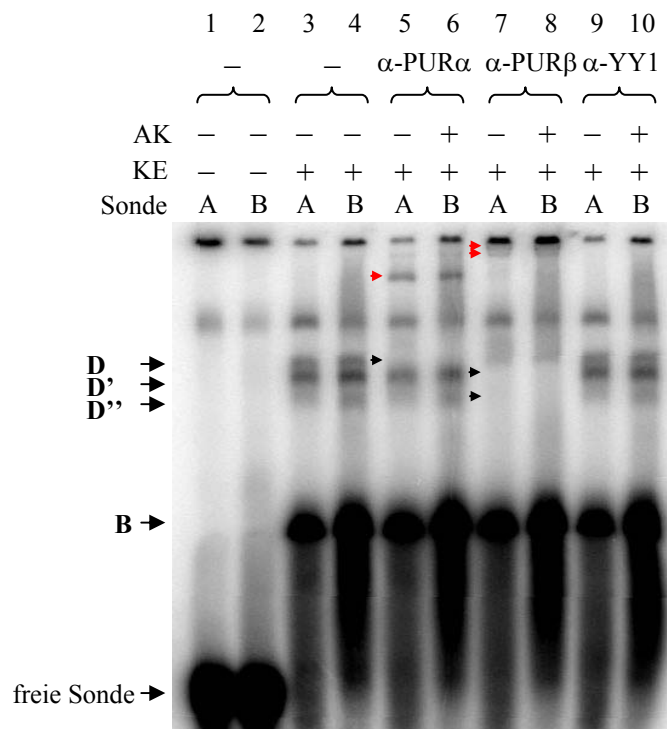


Abb. 2.25 EMSA-supershift Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen PUR α und β

Das Autoradiogramm repräsentiert ein EMSA-supershift Experiment mit humanem Kernextrakt zur Verifizierung einer PUR α / β -spezifischen Beteiligung an der Formierung der sE26re charakteristischen Protein-DNA Komplexe. Standardreaktionsansätze der DNA-Sonden sE26re (A) und PUR 2 (Positivkontrolle, B) wurden mit den Antikörpern anti-PUR α (5 und 6), anti-PUR β (7 und 8) und anti-YY1 (Negativkontrolle, 9 und 10) versetzt. Im Vergleich zu den Kontrollansätzen (3 und 4) hat die Zugabe von anti-PUR α bzw. anti-PUR β Antikörper das Verschwinden der Komplexe D-D'' zur Folge (schwarze Pfeilspitzen), wohingegen die DNA-Komplexe des Faktor B unverändert bleiben. Die entsprechenden supershifts werden durch rote Pfeilspitzen angezeigt. AK: Antikörper; KE: Kernextrakt

stränge ein verlangsamtes Laufverhalten im Gel (rote Pfeilspitze, Reihe 7 und 8). Die Anwesenheit von anti-YY1 Antikörper (Negativkontrolle, Reihe 9 und 10) hingegen hat keinen Einfluss auf die gezeigten DNA-Protein Komplexe und entspricht komplett dem Standard-Muster (Reihe 3 und 4). Somit unterstreichen diese Beobachtungen eine Beteiligung von PUR α (Faktor D) und PUR β (Faktor D' und D'') innerhalb des spezifischen Proteinbesatzes der sE26re DNA-Sequenz. Da der DNA-Faktor B Komplex auch bei signifikant größeren Mengen der Antikörper im EMSA-Ansatz keine Veränderungen gezeigt hat (Daten nicht gezeigt), liegt der Schluss nahe, dass es sich hierbei um ein anderes, bisher nicht bestimmtes Protein handeln.

Zusätzlich konnten die eingangs erwähnten Faktoren A bzw. A', welche ebenfalls spezifische Assoziation an DNA-Fragmente der dritten destabilisierten Region HS3 aufwiesen, mittels analytischer EMSA-Studien und EMSA-supershift Experimente als Oct-1 Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Stellamanns, 2005). Anders als alle anderen für HS3 beschriebenen, spezifischen DNA-Protein Komplexe, welche lediglich bei einer bzw. zwei überlappenden EMSA Sonden beobachtet werden konnten, besitzt Oct-1 in der promotorproximalen destabilisierten Region über einen Bereich von etwa 175 bp (EMSA-

Sonden 19-24, vgl. Abb. 2.7) vier degenerierte DNA-Bindungsstellen. Die Homologien der entsprechenden Oktamer-Elemente schwanken, verglichen mit dem ursprünglich determinierten Oct-1 Konsensus-Motiv 5'-ATTTGCAT-3', zwischen 63 und 100 %. Darüber hinaus konnten anhand von Homologievergleichen weitere Oct-1 DNA-Erkennungssequenzen in schwach destabilisierten Regionen zwischen den Hauptminima HS1 bis HS3 (vgl. Abb. 1.1), in der sE7 DNA-Region (HS2), sowie dem humanen IFN- β Promotorbereich vorhergesagt und biochemisch via EMSA-Untersuchungen verifiziert werden (Stellmanns, 2005; siehe auch Abb. 2.23). Somit stellt Oct-1 den häufigsten Vertreter für alle identifizierten Protein-DNA Interaktionsloci innerhalb des untersuchten Kontrollbereichs der IFNB1-Domäne dar.

2.5 Verifizierung von regulatorischen Eigenschaften der identifizierten Proteine YY1 und YY2 auf den humanen IFN- β Promotor

2.5.1 Einfluss transienter YY1 und YY2 Expression auf stabil integrierte Reportergenkonstrukte des Kontrollbereichs der humanen IFNB1-Domäne

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass YY1 und YY2 spezifisch an die sE7 DNA-Sequenz aus der zweiten destabilisierten Region HS2 binden (siehe Abb. 2.21 und 2.22A/B). Die EMSA0c-Sonde aus dem Bereich des HS1-Minimums wurde diesbezüglich bisher nicht näher untersucht, doch es kann von gleichen Bindungseigenschaften gegenüber den Yin Yang-Proteinen ausgegangen werden (vgl. Abb. 2.6B). Mutationsanalysen der YY1/YY2 Bindungsstelle, sowohl im EMSA0c-Fragment, als auch innerhalb der sE7 DNA-Sequenz, haben bewiesen, dass beide DNA-Bereiche eine essentielle Rolle bei der Induzierbarkeit bzw. der Aktivität des humanen IFN- β Promotors spielen (siehe Abb. 2.16 und 2.18).

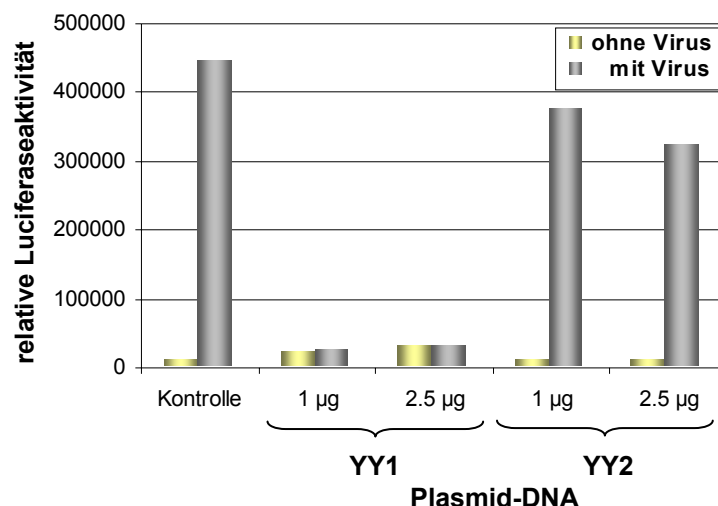


Abb. 2.26 Einfluss von überexprimiertem YY1 und YY2 auf stabile P + EcoC Klone-mische

Das Diagramm verdeutlicht den starken reprimierenden Effekt, den transiente Überexpression von YY1 auf die Induzierbarkeit des stabil integrierten Kontrollbereichs der humanen IFNB1-Domäne ausübt. Ferner weist der Grundzustand eine verstärkte Derepression auf. Erhöhte zelluläre Konzentrationen an YY2-Protein zeigen hingegen keinen Einfluss auf die Transgenaktivität vor und nach Virusinduktion.

Ob die zuletzt erwähnten Beobachtungen tatsächlich in direktem Zusammenhang mit YY1 oder YY2 stehen, wird in diesem Abschnitt näher untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Klongemisch mit stabil in murine LM(Tk⁻)-Zellen integriertem P + EcoC-Konstrukt (vgl. Abb. 2.15) generiert. Anschließend wurde diese Reporter-genkonstrukt-Zelllinie mit unterschiedlichen Mengen (1 und 2.5 µg) YY1- bzw. YY2-Expressionsplasmid transient transfiziert, 72 h später mit NDV induziert und nach weiteren 24 h die Luciferaseaktivität bestimmt. Die auf den Proteingehalt der Lysate normierten relativen Luciferaseaktivitäten sind graphisch in Abbildung 2.26 dargestellt, wobei der nicht-induzierte Zustand (weiße Balken) stets neben dem entsprechenden induzierten Ansatz (schwarze Balken) aufgetragen worden ist. Während das transient exprimierte YY2, im Vergleich zur Kontrolle (K, ohne Plasmid-DNA), weder im nicht-induzierten noch im induzierten Zustand, eine nennenswerte Verminderung der relativen Luciferaseaktivität aufweist, fallen bei YY1 die Aktivitätswerte des mit NDV induzierten Ansatzes dramatisch ab. Ferner löst das überexprimierte YY1 zusätzlich eine leichte Derepression des humanen IFN-β Promotors im Reporter-genkonstrukt aus, so dass der Basalwert (- NDV) dem Induktionswert (+ NDV) nahezu gleich ist. Darüber hinaus steigt das Derepressionspotential mit zunehmender Menge des transfizierten YY1-Expressionsplasmids schwach an. Da in diesem Experiment bereits Sättigungseffekte des überexprimierten YY1-Proteins zu beobachten waren, wurden in einem weiteren Versuch deutlich geringere Mengen YY1-Expressionsplasmid (0.1-1 µg) zur Transfektion eingesetzt (Abb. 2.27). Dabei ist zu

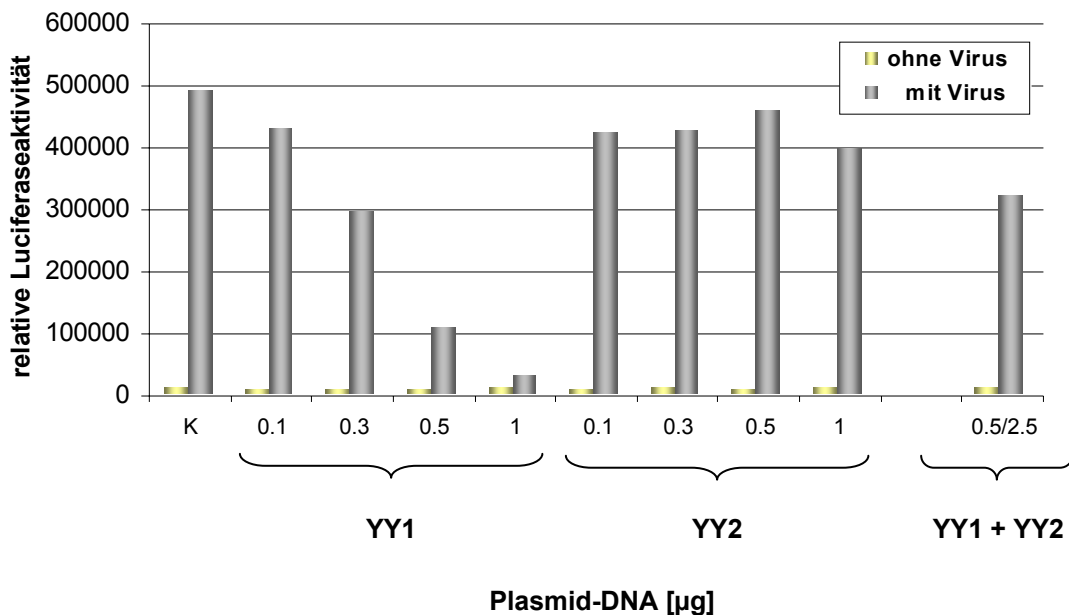


Abb. 2.27 Rekonstitution des Induktionspotenzials am humanen IFN-β Promotor

Transiente Überexpression von YY1 in steigenden Konzentrationen resultiert, im Gegensatz zu YY2, in einer sukzessiven Abnahme der Induzierbarkeit des humanen IFN-β Promotors bei stabil integrierten P + EcoC Luciferase-Reporter-genkonstrukten in murinen LM(Tk⁻)-Zellen (vgl. Abb. 2.26). Kotransfektion von YY1- und YY2-Expressionsplasmiden, im molaren Verhältnis 1:5, kehrt YY1-vermittelte Repressionseffekte in entsprechenden stabilen Klongemischen um.

beobachten, dass mit steigenden Konzentrationen an überexprimiertem YY1 eine kontinuierliche Reduktion der Induzierbarkeit bzw. der Aktivität des Promotors einhergeht. Das zuvor beschriebene Derepressionsphänomen (vgl. Abb. 2.26) des Promotors ist in diesem Experiment hingegen nicht zu erkennen. Grund hierfür sind Effizienzunterschiede in der transienten Expression von YY1. Entsprechende Mengen YY2-Expressionsplasmid zeigen keine Auffälligkeiten, weder im nicht-induzierten Zustand noch nach Zugabe von NDV. Das Verhalten von überexprimiertem YY1 legt einen Kompetitionsmechanismus nahe: YY1 verdrängt endogene Faktoren von den entsprechenden DNA-Bindungsplätzen. Da überexprimiertes humanes YY2-Protein keinen reprimierenden Einfluss auf den humanen IFN- β Promotor ausübt und außerdem eine fast identische DNA-Spezifität wie YY1 besitzt, könnte es sich bei einem dieser endogenen Faktoren um ein YY2-homologes murines Protein handeln. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden Expressionsplasmide, kodierend für YY1 und YY2, in einem molaren Verhältnis von 1:5 (0.5 μ g/2.5 μ g) kotransfiziert. Das Ergebnis dieses Versuchs ist ebenfalls in Abbildung 2.27 dargestellt. Der molare Überschuss von YY2 zu YY1 vermag den Effekt von 0.5 μ g YY1-Expressionsplasmid allein (siehe linker Teil, Abb. 2.27) fast vollständig zu kompensieren. Diese Beobachtung deutet auf eine antagonistische Beteiligung von YY1 und YY2 bei der Regulation der Promotoraktivität des humanen IFN- β Gens hin.

2.5.2 Verifizierung weiterer potentieller YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen innerhalb des untersuchten Kontrollbereichs

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden zahlreiche Promotoren durch Bindung von YY1 aktiviert bzw. reprimiert. In einigen Fällen konnte zusätzlich eine Beteiligung von YY2 bei der transkriptionellen Regulation ermittelt werden (Nguyen *et al.*, 2004). Alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen sind nicht Promotor-assoziiert, sondern befinden sich flankierend an den destabilisierten Regionen HS1 (EMSA0c, -3.4 kb) und HS2 (sE7, -2.0 kb; vgl. Abb. 2.1 und 2.5). Zum Nachweis, dass die unter 2.5.1 angeführten Beobachtungen ausschließlich auf die YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen EMSA0c und sE7 zurückzuführen sind, wurde der bisher untersuchte Kontrollbereich der humanen IFNB1-Domäne (vgl. Abb. 1.1) nach weiteren potentiellen YY1/YY2 DNA-Erkennungssequenzen durchsucht. Neben einer von Weill und Mitarbeitern (2003) postulierten YY1 DNA-Bindungsstelle direkt innerhalb der Promotorregion konnten drei zusätzliche, dem 5'-AAAATGG-3'-Motiv zugrunde liegende, in weniger stark destabilisierten Bereichen lokalisierte Kandidatensequenzen ermittelt werden. Analytische EMSA-Untersuchungen sollten darüber Aufschluss geben, ob diese DNA-Fragmente die Bindung an YY1/YY2 vermitteln. Zunächst wurde die Promotorregion näher untersucht. Hier kam dieselbe DNA-Sequenz zum Einsatz, die zuvor unter 2.4.1 eine spezifische Oct-1-Bindung gezeigt hatte (P^{hu} , Abb. 2.23C). Als Positivkontrolle wurde neben der sE7-Sonde die murine Promotorsequenz (P^{mu} , Abb. 2.23C) hinzugezogen, deren YY1-Bindung in murinen Kernextrakten ausgiebig untersucht worden ist (Weill *et al.*, 2003).

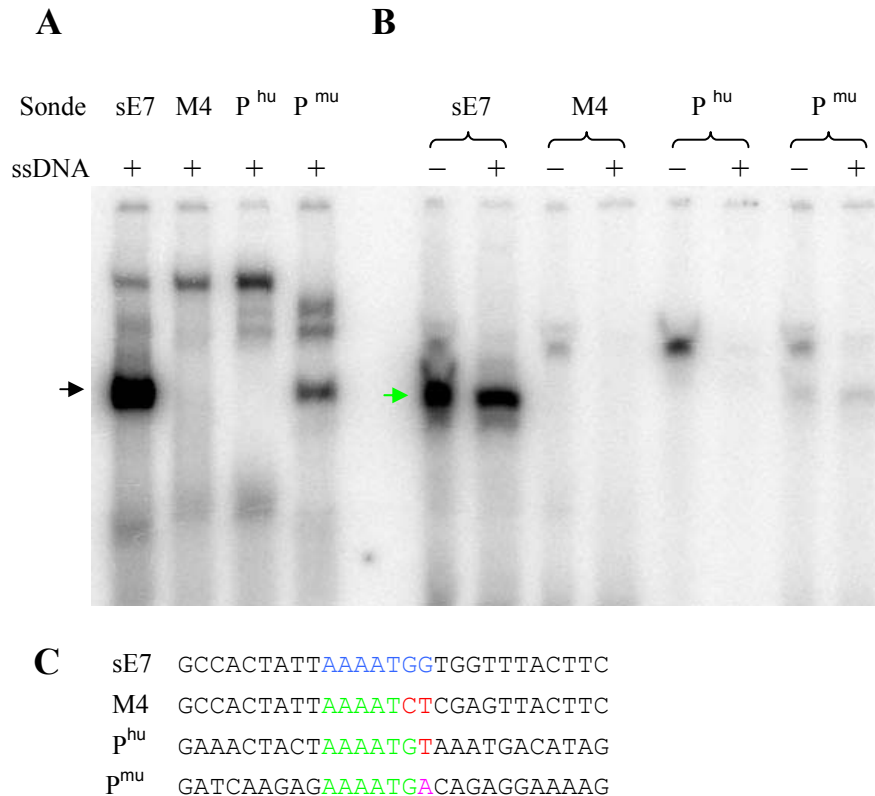


Abb. 2.28 Verifizierung einer YY1/YY2 DNA-Bindung am humanen und murinen IFN- β Promotor

A) Der analytische EMSA mit murinem Kernextrakt aus 2₄-Zellen zeigt YY1/YY2-DNA Komplexe unterschiedlicher Affinität für die humane sE7 und die murine Promotor (P^{mu}) DNA-Sequenz, wohingegen die YY1/YY2 Negativmutante M4 und die humane Promotorsequenz (P^{hu}) keine Interaktion vermitteln (schwarze Pfeil). **B)** EMSA-Untersuchungen mit *in vitro* translatiertem FLAG-YY2 (grüner Pfeil) bestätigen die unter A) gezeigte Spezifität, wobei die sE7-Sonde ebenfalls eine höhere Affinität als P^{mu} aufweist. **C)** Auflistung der getesteten DNA-Fragmente. Grüne Markierungen geben Übereinstimmungen zur YY1/YY2 DNA-Bindungsstelle (blau) der sE7-Sequenz wieder, während kritische Basensubstitutionen rot und konservierte Mutationen rosa hervorgehoben werden. ssDNA: 200-fach molarer Überschuss an unspezifischer, einzelsträngiger Kompetitor-DNA

Das Ergebnis dieser, mit murinem 2₄-Kernextrakt durchgeführten, EMSA-Studie zeigt, dass nur die beiden Positivkontrollen mit YY1/YY2 interagieren können (schwarze Pfeil, Abb. 2.28A), wobei die Affinität für das sE7 DNA-Fragment deutlich stärker ist. Die DNA-Sequenz aus dem humanen IFN- β Promotor (P^{hu}) hingegen ergibt, ebenso wie die Negativkontrolle (M4), keinen entsprechenden Protein-DNA Komplex und kann somit als YY1/YY2-Bindungsstelle ausgeschlossen werden. Parallel durchgeführte EMSA-Experimente mit *in vitro* translatiertem YY2 (Abb. 2.28B) bestätigen diese Beobachtung. Auch hier zeigen nur die Sonden sE7 und P^{mu} eine Assoziation von YY2 mit einem vergleichbaren Affinitätsunterschied zugunsten der sE7 DNA-Erkennungssequenz. Ausschlaggebend dafür, dass die Sonde aus der humanen Promotorsequenz keine YY1/YY2 DNA-Bindung mehr vermitteln kann, ist eine Basensubstitution (Abb. 2.28C; G \rightarrow T) im sE7 *core*-Motiv (vgl. 2.1.1).

Um unabhängig vom EMSA zu bestätigen, dass die beobachteten Effekte einer YY1-Überexpression auf direkte Wechselwirkungen mit dem humanen IFN- β Promotor beruhen, wurden entsprechende Studien in murinen LM(Tk⁻)-Klongemischen, mit stabil integriertem Minimalpromotor Reportergenkonstrukt (P, vgl. Abb. 2.15) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen jeweils mit 0.5 μ g YY1- bzw. YY2-Expressionsplasmid transient transfiziert und relevante Einflüsse der überexprimierten Proteine auf den Promotor bestimmt. Dies geschah durch einen Vergleich der relativen Luciferaseaktivitäten vor und nach Virusinduktion im Bezug auf einen Kontrollansatz. Die Ergebnisse dieses Experiments sind graphisch in Abbildung 2.29 dargestellt. Hier zeigt sich, dass beide Proteine in größeren zellulären Konzen-

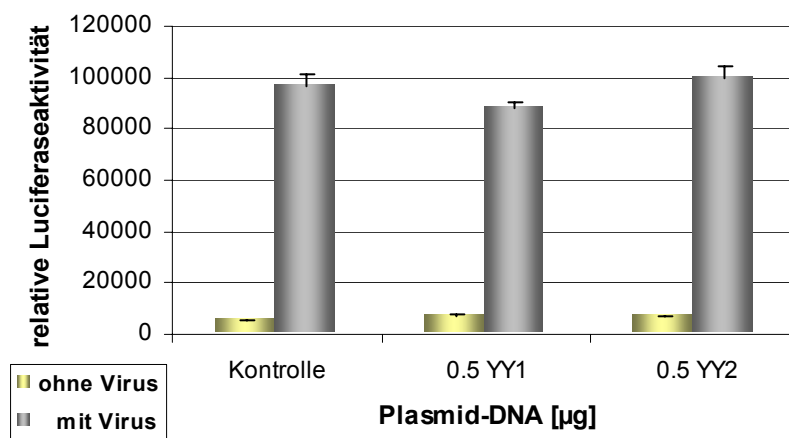


Abb. 2.29 Direkter Einfluss von YY1 und YY2 auf den humanen IFN- β Promotor

Die Abbildung zeigt, dass Überexpression von YY1 bzw. YY2 keine Auswirkungen auf den Grundzustand (ohne Virus) und die Induzierbarkeit (mit Virus) des stabil in murinen LM(Tk⁻)-Zellen integrierten humanen IFN- β Promotor-Luciferase-Reportergenkonstrukts (P, vgl. Abb. 2.15) nach sich zieht.

trationen weder die Repression des Promotors, noch dessen Induktion zu beeinflussen imstande sind. Dieser Befund unterstreicht, dass der humane Promotorbereich über keine funktionelle YY1/YY2 DNA-Bindungsstelle verfügt.

Die EMSA-Untersuchungen zur Verifizierung der verbliebenen drei potentiellen YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen erhärten den Verdacht, dass sich die einzig funktionell relevanten YY1/YY2 DNA-Elemente des untersuchten Kontrollbereichs der humanen IFNB1-Domäne auf die HS1- und HS2-assoziierten DNA-Fragmente beschränken. Außer der Positivkontrolle (Reihe 1, Abb. 2.30A) weist keine der untersuchten Kandidatensequenzen eine nennenswerte Affinität für die YY1/YY2-Proteine auf. Ausschlaggebend hierfür dürften Punktmutationen (rot-markierte Basen, Abb. 2.30B), innerhalb der YY1/YY2 Konsensus-Sequenz (blau-markierte Basen) sein.

Zusammenfassend zeigen die aufgeführten Beobachtungen, dass sich funktionelle YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen, des in dieser Arbeit untersuchten Bereichs der humanen IFNB1-Domäne, ausschließlich auf zwei DNA-Elemente (EMSA0c und sE7) der SIDD-Minima HS1 und HS2 beschränken. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass YY2 ebenfalls den murinen IFN- β Promotor zu binden vermag.

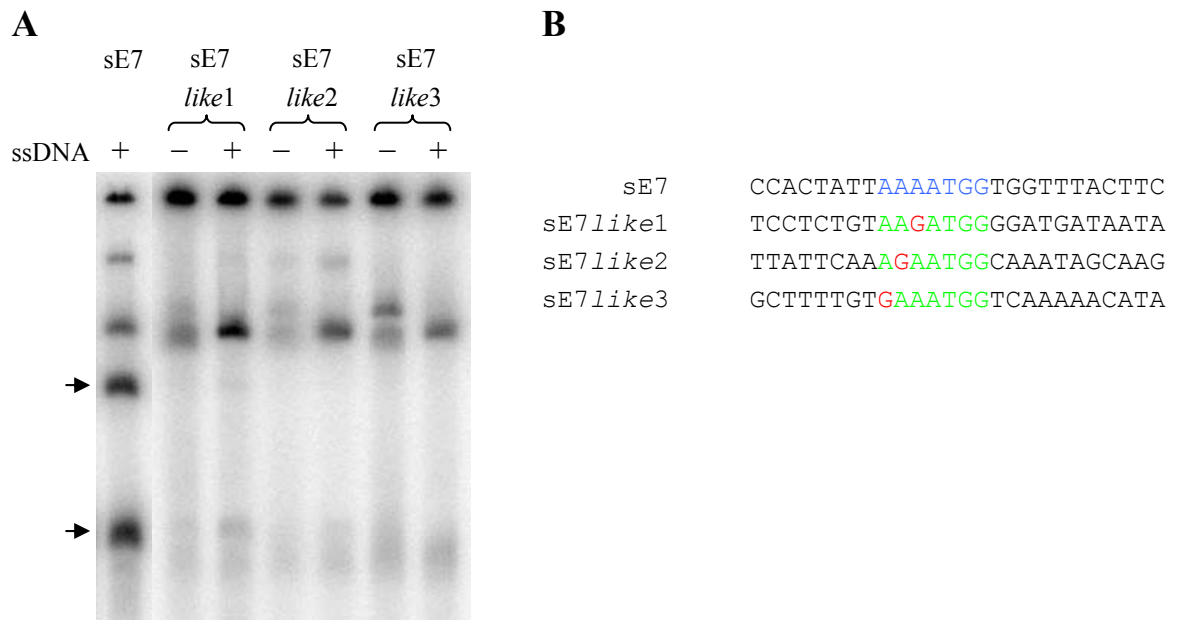


Abb. 2.30 Überprüfung von weiteren potentiellen YY1/YY2 DNA-Bindungsplätzen im Kontrollbereich der humanen IFNB1-Domäne

A) Der analytische EMSA vergleicht die YY1/YY2-Interaktion der sE7 DNA-Sequenz (Positivkontrolle, Reihe 1) mit drei zusätzlich innerhalb des Kontrollbereichs der humanen IFNB1-Domäne vorkommenden, potentiellen YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen (sE7like1-3). Nur die Positivkontrolle weist eine moderate Affinität für YY1/YY2 aus humanen MG63-Kernextrakten auf (schwarze Pfeile). **B)** Dargestellt sind die DNA-Sequenzen der in A) analysierten Sonden. Übereinstimmungen mit dem sE7-Motiv (blau) sind grün markiert, wohingegen kritische Basensubstitutionen rot gefärbt sind. ssDNA: 200-fach molarer Überschuss an unspezifischer, einzelsträngiger Kompetitor-DNA

2.5.3 *In vivo* Beteiligung von Yin Yang-Proteinen an der Regulation der humanen IFN- β Produktion

Die bisherigen, auf EMSA-Experimente beruhenden, *in vitro* Daten unterstreichen, ebenso wie die *in vivo* Ergebnisse von stabilen Klongemischen in heterologen Zellsystemen, eine regulatorisch bedeutende Rolle von Yin Yang-Proteinen auf den humanen IFN- β Promotor. Ob jedoch der endogene Promotor vergleichbar sensitiv auf zellulär erhöhte YY1-Konzentrationen reagiert, wie es bisher für exogen eingebrachte Reportergenkonstrukte beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 2.26 und 2.27), wurde in diesem Teil der Arbeit näher untersucht. Außerdem wurde abschließend eine *in vivo* DNA-Assoziation von YY1 und YY2, am Beispiel der entsprechenden DNA-Bindungsstelle der Region HS2, mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) überprüft.

Zur Untersuchung des Einflusses hoher YY1-Level auf den endogenen IFN- β Promotor wurden humane MG63-Zellen zunächst mit 0.3 bzw. 0.5 μ g des entsprechenden YY1-Expressionsplasmids transfiziert. Nach Induktion der IFN- β Produktion durch Viruszugabe wurde der Titer des sezernierten IFN- β im Kulturüberstand mittels eines Interferontests bestimmt (Abb. 2.31). Die graphische Darstellung der produzierten IFN- β Menge offenbart deutlich, dass transiente Überexpression von YY1 schon in geringen Konzentrationen

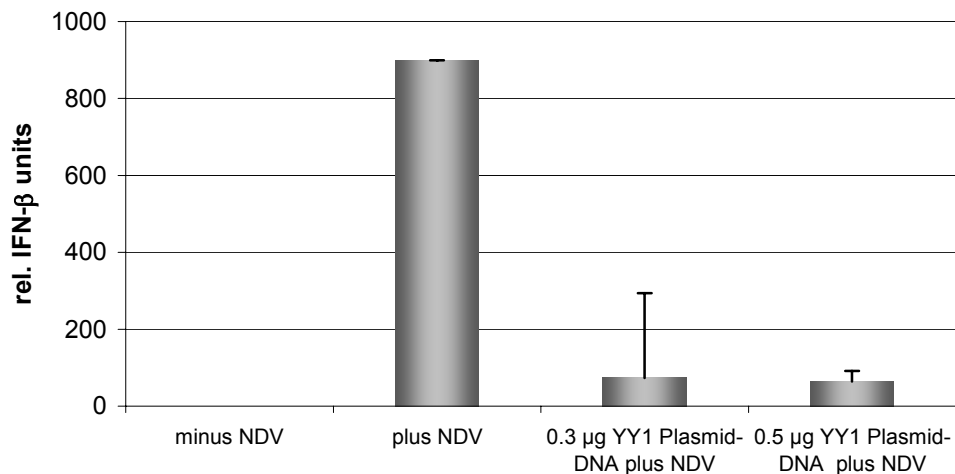


Abb. 2.31 Effekt von überexprimiertem YY1 auf den endogenen IFN- β Promotor von humanen MG63-Zellen

Humane MG63 Zellen wurden, im Vergleich zu Kontrollzellen, mit 0.3 bzw. 0.5 μ g YY1-Expressionsplasmid transfiziert, der endogene IFN- β Promotor durch Viruszugabe (NDV) induziert und die IFN- β Expression mittels Interferontest bestimmt (siehe 4.10.2.8.3). Während die Induktion der IFN- β Expression bei nicht-induzierten (minus NDV) und induzierten (plus NDV) Kontrollzellen deutlich zu erkennen ist, weisen die transient YY1-überexprimierenden Zellen schon bei einer geringen Erhöhung des endogenen YY1-Niveaus einen signifikanten Einbruch der IFN- β Produktion auf.

einen signifikanten Einfluss auch auf den endogenen humanen IFN- β Promotor ausübt. So weisen nicht-transfizierte Kontrollzellen nach Virusinduktion eine bis zu 10-fach größere Menge an sezerniertem IFN- β auf als die Zellen, welche zuvor mit dem YY1-Expressionsplasmid transfiziert worden sind. Der geringe Unterschied bei der IFN- β Produktion zwischen den zwei Transfektionsansätzen impliziert, dass die Menge des überexprimierten YY1-Proteins in beiden Fällen bereits ein zelluläres Sättigungsniveau erreicht hat (vgl. Abb. 2.26).

Zum Abschluss dieser Arbeit wurde die *in vivo* DNA-Bindung von YY1 und YY2 in humanen MG63-Zellen mittels ChIP-Technik am Beispiel des sE7-Motivs der destabilisierten Region HS2 überprüft. Da kein geeigneter, natives YY2 erkennender Antikörper zur Verfügung stand, wurde N-terminal mit einem FLAG-tag fusioniertes YY2 zunächst in humanen MG63-Zellen überexprimiert, und dessen DNA-Bindung unter Zuhilfenahme eines anti-FLAG Antikörpers im ChIP-Experiment überprüft. Für den YY1 Nachweis wurden hingegen Wildtyp MG63-Zellen und ein ChIP-erprobter anti-YY1 Antikörper (SantaCruz,

sc-1703; Kim *et al.*, 2003) eingesetzt. In Abbildung 2.32 ist eine PCR-Analyse der immunpräzipitierten DNA-Fragmente unter Verwendung einer Primerpaar-Kombination (P1946/P986) dargestellt, welche spezifisch den entsprechenden HS2-Bereich amplifiziert. Im Vergleich zu den PCR-Kontrollen mit H₂O (Reihe 2) und genomischen DNA-Fragmenten (Reihe 3), sowie der ChIP-Negativkontrolle ohne Antikörper (Reihe 5), zeigen nur die Ansätze für YY2 (Reihe 4) und YY1 (Reihe 6) eine signifikante Anreicherung der spezifisch immunpräzipitierten HS2 DNA-Sequenz. Dieser Befund spricht für eine *in vivo* Bindung von YY1 und YY2 an die sE7 DNA-Sequenz unter nicht-induzierten Bedingungen.

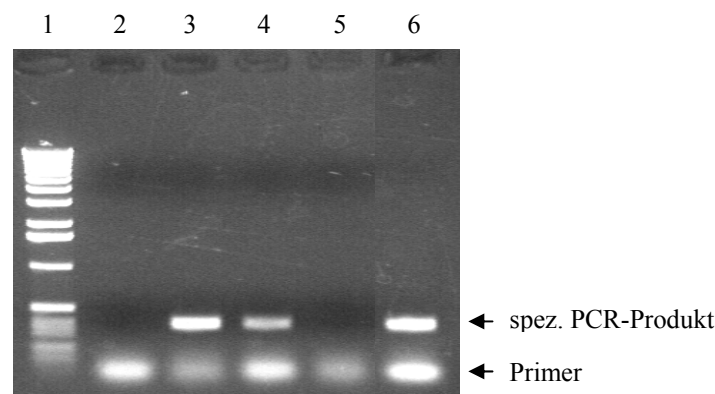


Abb. 2.32 Chromatin Immunpräzipitationsexperimente am Beispiel des sE7 DNA-Fragments

Das ChIP Experiment zeigt eine direkte *in vivo*-Interaktion zwischen FLAGYY2 bzw. YY1 mit der sE7 DNA-Sequenz. Die ChIP-Untersuchungen wurden wie unter 4.5.5 beschrieben mit Antikörpern anti-FLAG (gegen YY2-Fusionsprotein, 4) und anti-YY1 (6), durchgeführt. Als ChIP-Negativkontrolle wurde in Ansatz 5 kein Antikörper eingesetzt. PCR-Kontrollen mit H₂O (Negativkontrolle) und genomischen DNA-Fragmenten (Positivkontrolle) sind in Reihe 2 bzw. 3 aufgetragen.

Generell konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die Überexpression von YY1 erhebliche inhibitorische Einflüsse auf die Induzierbarkeit des endogenen humanen IFN- β Promotors zur Folge hat. Wann und vor allem wo YY1, YY2 und vielleicht sogar eine Oct-1 DNA-Bindung innerhalb des untersuchten Bereichs der IFNB1-Domäne erfolgt, werden zukünftige ChIP-Untersuchungen aufdecken. Hier konnten schon erste *in vivo* Hinweise auf eine YY1/YY2 DNA-Interaktion mit dem sE7 DNA-Fragment im zellulären Grundzustand erzielt werden (siehe Diskussion).

3. Diskussion & Ausblick

Nach heutigem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass eukaryontische Genome in regulatorisch unabhängige Einheiten, Chromatin-Schlaufendomänen, gegliedert sind, welche neben kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenzen auch die für DNA-Replikation und Transkription wichtigen *cis*-regulatorischen DNA-Elemente beinhalten. Einige dieser Elemente weisen dabei eine promotornahe Lokalisierung auf, wohingegen andere tausende von Basenpaaren entfernt liegen. Klassisch werden diese regulatorisch relevanten DNA-Bereiche mittels standardisierter biochemischer Verfahren identifiziert. Vor allem Gen-nahe, somit meist Promotor-assoziierte, *cis*-agierende DNA-Elemente werden aufgrund ihrer (Hyper-) Sensitivität gegenüber exogen zugeführten Nukleasen, wie S1 und DNase I, kartiert. Weitaus schwieriger hingegen ist die Bestimmung derartiger DNA-Areale, wenn sie nicht innerhalb von Promotorsequenzen, sondern im 5'- (*upstream*), 3'- (*downstream*) oder sogar zwischen den kodierenden DNA-Bereichen, Intron-assoziiert, lokalisiert sind. Dies ist auch einer der Gründe, warum relativ wenig über die molekularen Mechanismen bekannt ist, wie proximale und distale regulatorische Elemente Entwicklungs- und Gewebe-spezifische Genaktivität regulieren. Erleichterung diesbezüglich sollen moderne biomathematische Vorhersagealgorithmen, wie das SIDD-Profil (Benham *et al.*, 1997) bieten, dessen Vorhersagepotential für regulatorisch wirksame DNA-Loci im Rahmen dieser Arbeit biochemisch verifiziert wurde. In der vorliegenden Arbeit kamen systematische *in vitro* EMSA-Studien zur Identifizierung spezifischer Protein-DNA Komplexe, sowie *in vivo* Analysen transgener Reportergenkonstrukte der humanen IFNB1-Domäne in heterologen Zellen zum Einsatz.

3.1 Korrelation von SIDD-Minima und spezifischen Transkriptionsfaktor DNA-Bindungsstellen

Der Fokus dieser Studien richtete sich auf drei dominant destabilisierte DNA-Regionen der humanen IFNB1-Domäne innerhalb eines etwa 5 kb großen Kontrollbereichs *upstream* der Promotorsequenz des IFN- β Gens (vgl. Abb. 1.1). Umfassende Mappierungsexperimente zur DNase I-Sensitivität dieser Region ergaben deutliche Signale für DNase I-hypersensitive Stellen (HS; Bode *et al.*, 1986; Ernst, 2000), welche als Marker regulatorischer Elemente gelten (Gross und Gerard, 1988). Ein Vergleich zum SIDD-Profil zeigte dabei eine hohe Übereinstimmung der HS zu den SIDD-Minima (Knopp, 2001). Somit scheinen diese Orte auf dem Vorliegen besonderer DNA-Strukturen, Regionen mit erhöhter Tendenz zur Einzelstrangbildung, zu beruhen (Benham *et al.*, 1997). Vergleichbare Befunde an bereits zuvor identifizierten und charakterisierten regulatorischen Elementen der murinen Kollagen (*Col1a1*)- und der homologen humanen COL1A1-Gen-Domäne legen eine universelle Bedeutung solcher DNA-Eigenschaften nahe (Mielke *et al.*, 2002). Möglicherweise vermitteln derartige DNA-Bereiche über akzessorische Proteine diverse Funktionen, wie die Bildung einer weiteren Organisationsebene von Chromatinstrukturen oder zellspezifische trans-

kriptionelle Verstärkungen als *enhancer*-Elemente. Ferner steuern sie die Initiation bzw. Termination der Transkription. Die systematischen EMSA-Untersuchungen aller drei destabilisierten Regionen (HS1-HS3) des Kontrollbereichs der IFNB1-Domäne erbrachten Hinweise auf DNA-Bindungsstellen für mindestens sechs verschiedene spezifische Faktoren (vgl. Abb. 2.6B, 2.9 und 2.11). Interessanterweise zeigte dabei nur die Hälfte der entsprechenden DNA-bindenden Proteine eine Spezifität für rein einzelsträngige DNA-Sequenzen, wohingegen die übrigen Protein-DNA Komplexe ausschließlich auf DNA-Doppelstrang-bindende Faktoren zurückzuführen sind. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die jeweiligen DNA-Bereiche nicht konstitutiv in einer einzelsträngigen DNA-Konformation vorliegen, sondern möglicherweise je nach Aktivitätszustand des induzierbaren IFN- β Gens moduliert werden.

3.1.1 Nachweis der DNA-Doppelstrang-bindenden Faktoren YY1 und YY2

Für die beiden destabilisierten Regionen HS1 und HS2 des Kontrollbereichs der IFNB1-Domäne konnten anhand systematischer EMSA-Untersuchungen zunächst zwei identische Doppelstrang-spezifische Protein-DNA Komplexe identifiziert werden (vgl. Abb. 2.6B). Die DNA-Doppelstrang-Spezifität dieser Faktoren steht in diesem Fall nicht im Widerspruch zum erhöhten Destabilisierungspotential der untersuchten Bereiche, da sie in weniger stark destabilisierten Regionen am Rand von HS1 bzw. HS2 lokalisiert sind. Diese DNA-Elemente können durchaus dauerhaft eine DNA-Doppelhelix aufweisen. Darüber hinaus wird angenommen, dass auch Bereiche, die SIDD-Minima aufweisen, in Abwesenheit von superhelikaler Spannung überwiegend doppelsträngig sind. Datenbankrecherchen mit dem identifizierten *core*-DNA-Bindungsmotiv 5'-ATGG-3' beider DNA-Fragmente ergaben unter Verwendung der Transkriptionsfaktor-Suchmaschine TESS, basierend auf dem aktuellsten TRANSFAC-Datensatz (Wingender *et al.*, 1996 und 2000), wiederholt hochprozentige Treffer für das Protein *common factor 1* (CF1; Kakkis und Calame, 1987). Ein anschließender Literaturvergleich zeigte, dass der 1987 beschriebene Faktor CF1 weitere Synonyma besitzt. Darunter UCRBP (Flanagan *et al.*, 1992) und NF-E1 (Park und Atchison, 1991), welche in zwei unabhängigen Studien als transkriptionelle Repressoren identifiziert wurden, δ -Faktor, einem transkriptionellen Aktivator (Hariharan *et al.*, 1991) und die mittlerweile geläufigste Bezeichnung Yin Yang 1 oder YY1 (Shi *et al.*, 1991 und 1997). Der zuletzt genannte Name reflektiert dabei die duale transkriptionelle Aktivität dieses multifunktionellen Transkriptionsfaktors, welcher in Abhängigkeit von der den Promotor umgebenden DNA-Sequenz (Shrivastava und Calame, 1994), der relativen zellulären Konzentration (Bushmeyer *et al.*, 1995) und Zelltyp-spezifischen Faktoren (Bauknecht *et al.*, 1996; Inouye und Seto, 1994; Lee *et al.*, 1995a; Shrivastava *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1995) sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren kann. Das 44 kDa große, insgesamt 414 Aminosäuren umfassende Protein (Accession No. NP_003394) gilt, aufgrund seiner vier C-terminal lokalisierten C₂H₂-Zinkfingerdomänen (aa 298-397), als Mitglied der GLI-Krüppel Familie von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (Ruppert *et al.*, 1988). Weitere Domänen, deren exakte Eingrenzung sich nicht in allen Fällen als einfach erweist, sind in Abbildung 3.1A dargestellt.

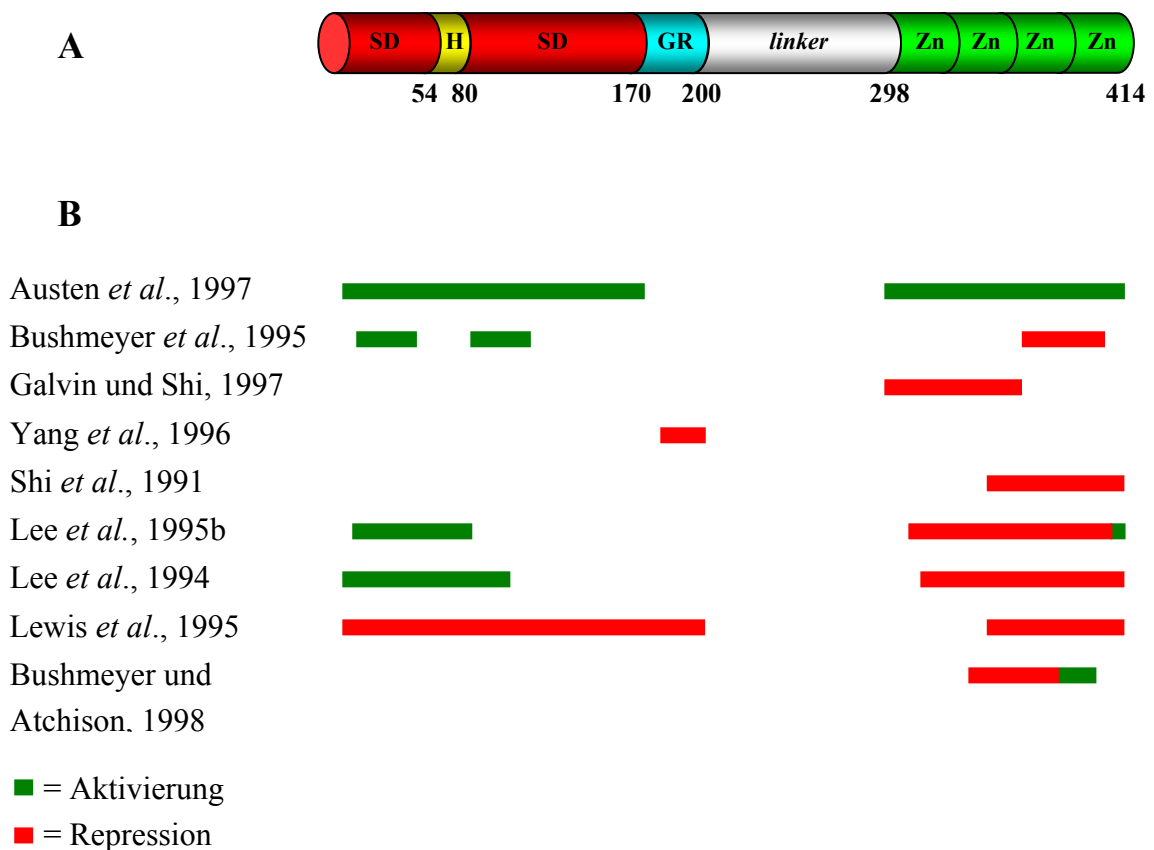


Abb. 3.1 Domänenstruktur von YY1

A) Die Grafik zeigt die schematische Darstellung der charakteristischen Domänen von YY1 entsprechend der Sequenzkomposition. Die Zahlen beziehen sich auf die jeweiligen Aminosäurepositionen der Domänengrenzen: SD, saure Domäne; H, Histidin-reiche Domäne; GR, Glycin-reiche Domäne; Zn, Zinkfinger. B) Hinweis auf die Bereiche der funktionellen Aktivierung (grün)- bzw. Repressionsdomänen (rot) von YY1 entsprechend publizierter Kartierungsstudien der angegebenen Referenzen (modifiziert nach Thomas und Seto, 1999).

Als besonders schwierig stellt sich die strukturelle Analyse der Aktivierungs- und Repressionsdomänen dieses multifunktionellen Proteins heraus. Die Ergebnisse einer Vielzahl von Experimenten unterschiedlicher Arbeitsgruppen sind zusammengefasst in Abbildung 3.1B dargestellt. Hierbei ist offensichtlich, dass sich viele Befunde zum Teil erheblich widersprechen. Deutlichstes Beispiel ist die Kartierung der Aktivierungsdomäne. Obgleich die meisten Gruppen darin übereinstimmen, dass die Aktivierungsdomäne nahe dem N-Terminus existiert (Bushmeyer *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994), deuten detailliertere Studien auf eine zweigeteilte Domänenstruktur hin (Austen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1995b). Unabhängig davon berichteten mehrere Gruppen von einer Aktivierungsdomäne im Bereich der Zinkfingerregion des YY1-Proteins (Bushmeyer und Atchison, 1998). Wie der Abbildung 3.1B zu entnehmen ist, birgt auch die Lokalisierung der Repressionsdomäne Schwierigkeiten (vgl. Bushmeyer *et al.*, 1995; Galvin und Shi, 1997; Yang *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994 und 1995b; Lewis *et al.*, 1995; Bushmeyer und Atchison, 1998). Als vermeintliche Fehlerquelle für

die offensichtlich gegensätzlichen Kartierungsergebnisse von Aktivierungs- und Repressionsdomäne wurde die jeweils angewandte Technik bzw. das benutzte System geltend gemacht (Thomas und Seto, 1999).

Ein wichtiger Mechanismus, durch welchen die YY1-Funktionen reguliert werden, ist die physikalische Interaktion mit weiteren Faktoren. Angaben zur Anzahl der Proteine, welche direkt mit YY1 wechselwirken können, sind einem ständigen Fluss unterworfen. Interessanterweise sind viele der mit YY1 interagierenden Proteine entweder Koaktivatoren und Korepressoren oder Transkriptionsfaktoren, welche eine Vielzahl von unterschiedlichen Promotoren regulieren. Bisher konnten direkte Interaktionen mit folgenden Proteinen bestätigt werden: TBP, TAF_{II}55, TFIIB, E1A, CBP/p300, PCAF, c-Myc (Shrivastava *et al.*, 1993; Chiang und Roeder, 1995; Lewis *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995b; Galvin und Shi, 1997; Austen *et al.*, 1997 und 1998; Yao *et al.*, 2001), HDACs 1-3 (Davie und Chadee, 1998; Galvin und Shi, 1997), Sp1, ATF/CREB, PARP-1 (Seto *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993 und 1996; Oei *et al.*, 1997), B23, Cyclophilin A, FKBP12, C/EBP β , SAP30, Rb-Protein, YAF2 (Inouye und Seto, 1994; Bauknecht *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2003; Petkova *et al.*, 2001; Kalenik *et al.*, 1997) und auch mit RNA-Polymerase II (Galvin und Shi, 1997). Darüber hinaus konnte am Modell des humanen Histon-H4 Promotors gezeigt werden, dass YY1, auch bekannt als *nuclear matrix protein 1* (NMP-1), ein *scaffold/matrix attachment region* (S/MAR)-bindendes Protein ist (Dworetzky *et al.*, 1992). Über ein *nuclear matrix targeting signal* (NMTS) kann es mit weiteren Komponenten derselben interagieren und wird dadurch zu einem Bestandteil der nukleären Matrix (Guo *et al.*, 1995; Bushmeyer und Atchison, 1998; McNeil *et al.*, 1998). Guo und Mitarbeiter (1995) gehen davon aus, dass Transkriptionsfaktoren in der nukleären Matrix transient Gen-Matrix Interaktionen vermitteln können (Stein *et al.*, 1994; van Wijnen *et al.*, 1993; Bidwell *et al.*, 1993).

Die spezifische DNA-Doppelstrang-Bindung, welche über die Zinkfingerdomäne vermittelt wird, unterliegt einem oft modulierten Konsensus-Motiv, 5'-(A/c/g)(A/t)NATG-(G/a/t)(C/a)(G/c/t)-3' (Hyde-DeRuyscher *et al.*, 1995; Yant *et al.*, 1995). Konstant bleibt dabei stets ein zentral gelegenes, für die Komplexierung von YY1 essentielles 5'-ATG-3' *core*-Motiv. Die YY1 DNA-Bindungsstellen, die in dieser Arbeit für die DNA-Fragmente sE7 und EMSA0c beschrieben wurden, folgen nur in einem Falle der aktuellen Konsensussequenz (vgl. Abb. 2.6B). Während letztere eine vollständige Übereinstimmung zeigt, weist sE7 an zweiter Stelle nach dem 5'-ATG-3' *core*-Motiv statt eines bevorzugten Cytosin- bzw. eines weniger geeigneten Adeninrestes einen Thymidinrest auf. Eine derartige Variabilität an dieser Position konnte bereits beim Erstellen der früher gültigen Konsensussequenz 5'-AANATGGNG/C-3' beobachtet werden (Lee *et al.*, 1992; Shrivastava und Calame, 1994). Kim und Shapiro konnten durch Studien an synthetischen Promotoren feststellen, dass DNA-gebundenes YY1 die Fähigkeit besitzt, DNA-*bending* zu induzieren (Kim und Shapiro, 1996). Dies könnte, abhängig von der spezifischen Position eines entsprechenden YY1 *cis*-Elements, im Kontext weiterer DNA-Bindungsstellen für zusätzliche Transkriptionsfaktoren, signifikante Auswirkungen auf die transkriptionelle Regulation bestimmter Gene haben. Zusätzlich könnten YY1-vermittelte Promotoreinflüsse durch Konkurrenz mit anderen Transkriptionsfaktoren

mittels überlappender *cis*-Elemente modifiziert werden (Meier und Groner, 1994; Gualberto *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992; Vincent *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1994). EMSA-Experimente mit Kernextrakten aus verschiedenen humanen Zelltypen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wiesen stets zwei von der Signalstärke her fast gleichwertige YY1-spezifische *shifts* auf (Daten nicht gezeigt). Dem gegenüber ergaben Kernextrakte aus Zellen anderer Organismen wie Maus und Hamster ausschließlich einen dominanten Protein-DNA Komplex. Letzterer weist im EMSA-Gel exakt die gleiche elektrophoretische Mobilität auf, wie der am stärksten retardierte human-spezifische *shift* (Daten nicht gezeigt). Dieses unterschiedliche Bandenmuster deutet, im Vergleich zu murinem YY1, auf eine höhere Sensitivität des humanen YY1-Faktors gegenüber Proteasen hin (Gordon *et al.*, 2003).

Wie die zuvor beschriebenen Ergebnisse andeuten, handelt es sich bei YY1 um ein ubiquitär exprimiertes und hoch konserviertes Protein. Tatsächlich stellt YY1 einen von *Xenopus laevis* über Maus bis Mensch hoch konservierten Faktor dar (Shi *et al.*, 1997). Auch bei *Drosophila melanogaster* konnte ein sequenzspezifisches DNA-bindendes Protein namens PHO (*pleiohomeotic*), ein Mitglied der *polycomb-group*-Proteinfamilie, identifiziert werden, welches sich im Bereich der Zinkfingerdomäne durch eine Homologie von 95 % auszeichnet (Brown *et al.*, 1998). Über die DNA-bindende Region hinaus existieren zwischen YY1 und PHO keine weiteren, auf die Aminosäuresequenz bezogenen, Gemeinsamkeiten. Die Anzahl der zelleigenen und auch viraler Promotoren, welche durch YY1-Assoziation reguliert werden, ist erstaunlich hoch. Es wird angenommen, dass mehr als 7 % aller Vertebraten-Promotoren mindestens eine YY1 Konsensusbindungsstelle beinhalten (Hyde-DeRuyscher *et al.*, 1995); einige Beispiele sind c-Myc, c-Fos, p53, α -Actin, Histon H4, surf-2, grp78, IgH *enhancer*, β -Casein, Igg 3' *enhancer*, ρ -Globin, ϵ -Globin, γ -IFN, rpL30, rpL32, P5 aus AAV, E6 und E7 aus HPV, BZLF1 aus EBV, B6 aus B19-Parvovirus, VP5 aus HSV-1 und eine Vielzahl an anderen viralen LTRs (Shrivastava und Calame., 1994; Hyde-DeRuyscher *et al.*, 1995; Yant *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1997; Last *et al.*, 1999). Ebenso enorm ist die Vielzahl an Promotoren, für die eine YY1 DNA-Bindung postuliert wird. Interessanterweise sind verschiedene YY1-DNA-Erkennungsstellen sogar als die entscheidenden Initiator-Elemente einiger Promotoren identifiziert worden (Seto *et al.*, 1991; Basu *et al.*, 1993; Usheva und Shenk, 1994). Somit kontrolliert YY1 die Expression einer Vielzahl von Genen, von denen viele wichtig für grundlegende zelluläre Prozesse wie DNA-Replikation, Zellzykluskontrolle und, wie bereits erwähnt, die Transkription sind. Andere Gene sind hingegen direkt mit der Immunantwort, Krebs, viralen Infektionen und der Entwicklung verknüpft (Shi *et al.*, 1997; Thomas und Seto, 1999). YY1-*knock-out* Experimente führen zur Letalität von Mäusen während der Embryogenese, und unterstreichen die Wichtigkeit von funktionellem YY1 für fundamentale biologische Prozesse wie beispielsweise der Zellentwicklung (Donohoe *et al.*, 1999).

Eine weitere Ebene, die transkriptionell regulatorischen Funktionen von YY1 zu beeinflussen, stellen posttranslationale Modifikationen dar, indem die Affinität der DNA-Bindung, die Proteinstabilität und die Assoziation zu anderen Faktoren verändert werden. Im Jahr 2000 konnte gezeigt werden, dass die Histonacetyltransferasen (HATs) CBP/p300 und PCAF (p300-CBP-associated faktor) zusätzlich zu ihren eigentlichen Histonsubstraten auch

Transkriptionsfaktoren acetylieren können (Sterner und Berger, 2000). Eine Acetylierung bestimmter Lysinreste innerhalb der C-terminalen Zinkfingerdomäne des YY1-Moleküls führt bei humanen HeLa-Zellen zu einer verminderten DNA-Bindungsaktivität (Yao *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion mit aktivierter PARP-1 (*poly(ADP-ribose) polymerase* 1), einem Schlüsselenzym bei DNA-Reparaturmechanismen. Hier korreliert die kovalente Verknüpfung von YY1 mit Poly(ADP-ribose)-Seitenketten ebenfalls mit einer reduzierten DNA-Affinität (Oei und Shi, 2001). Eine derartige Modifikation von Transkriptionsfaktoren stellt einen effizienten Mechanismus dar, um die Expression beschädigter Gene zu verhindern. Eine nicht direkt die DNA-Bindung beeinflussende chemische Veränderung von YY1 ist die Stimulus-abhängige O-verknüpfte N-Acetylglucosaminierung (Hiromura *et al.*, 2003). Diese reversible Glykosylierungsreaktion (Hart, 1997) kann bei einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich Chromatin-assoziierten Proteinen und verschiedener Transkriptionsfaktoren (Vosseller *et al.*, 2002), beobachtet werden. Bei YY1 fördert diese Modifikation die Dissoziation eines Proteinkomplexes mit dem Retinoblastoma Protein (pRb) und erhöht somit die zelluläre Konzentration an freiem YY1. Das glykosylierte YY1 vermag daraufhin durch Bindung an entsprechende Promotorelemente die Aktivierung oder Repression bestimmter Gene zu beeinflussen. Ebenso wie viele andere Transkriptionsfaktoren kann YY1 zusätzlich phosphoryliert werden (Austen *et al.*, 1997; Hunter und Karin, 1992). Modifikationen dieser Art gehen bei einer großen Anzahl an Faktoren mit einer veränderten Proteinaktivität einher. Welche genaue Rolle die Phosphorylierung jedoch bei den zellulären Funktionen von YY1 spielt, konnte bisher nicht geklärt werden, denn zumindest bei Untersuchungen bezüglich Zellwachstum und Differenzierung wurden keine Unterschiede im Phosphorylierungsmuster festgestellt (Austen *et al.*, 1997).

Abgesehen von Modifikationen des YY1-Proteins selbst, welche die Protein-DNA Interaktion unterstützen oder verhindern, kann auch die Beschaffenheit der DNA-Erkennungsregion einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung dieses Komplexes nehmen. Studien zur YY1-Bindung an eine Isolatorsequenz innerhalb des paternal exprimierten murinen Peg3 Gens haben bewiesen, dass DNA-Methylierung eines CpG-Dinukleotids im entsprechenden maternalen Genloкус, die Assoziation von YY1 *in vivo* verhindert (Kim *et al.*, 2003).

Proteine, denen eine essentielle Bedeutung innerhalb des Zellhaushalts zukommt, weisen häufig multiple Isoformen auf. So ist mittlerweile bekannt, dass auch viele Transkriptionsfaktoren, welche zunächst als einzigartig galten, zu Proteinfamilien gehören. So existieren im Menschen verschiedene hoch konservierte homologe Proteine zu einem der ersten und am besten charakterisierten DNA-bindenden Faktoren, dem Sp1 Transkriptionsfaktor (Kingsley und Winoto, 1992; Hagen *et al.*, 1992, 1994 und 1995). Kürzlich wurde gezeigt, dass auch YY1 ein Mitglied einer Proteinfamilie ist. Anhand von DNA- und Aminosäuresequenz-Datenbankanalysen konnte in humanen HeLa-Zellen ein strukturell und funktionell verwandtes Protein, YY2 genannt, identifiziert werden (Nguyen *et al.*, 2004). In derselben Arbeit konnten zudem Hinweise auf einen weiteren YY1-homologen Faktor in

menschlichen Zellen gewonnen werden. Derartige Befunde deuten darauf hin, dass die YY1-vermittelte Genregulation weit komplizierter ist als bisher angenommen.

3.1.2 Das humane YY1-homologe Protein YY2

YY2 (Accession No. NP_996806) ist ein 372 Aminosäuren umfassendes Protein mit einer kalkulierten Molmasse von 41 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5.98. Unter Verwendung der Sequenzierungsdaten des humanen Genomprojekts konnte für das YY2-Gen eine X-chromosomale Lokalisierung (Xp22.1-22.2) ermittelt werden. Expressionsstudien ergaben, dass YY2, mit Ausnahme von Dickdarmgewebe, in einer Vielzahl von verschiedenen menschlichen Geweben exprimiert wird. Bezüglich der gesamten Primärsequenz sind YY2 und YY1 zu 56.2 % identisch, wohingegen die DNA-bindende Domäne der jeweils C-terminal gelegenen Zinkfingerregion zu 86.4 % konserviert ist (Abb. 3.2).

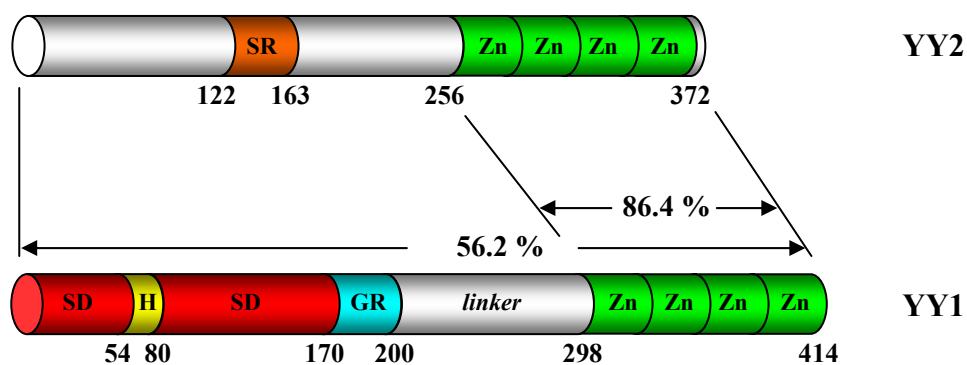


Abb. 3.2 Homologievergleich zwischen humanem YY1 und YY2

Gezeigt in eine schematische Domänenendarstellung der humanen Proteine YY1 und YY2. Die Angaben in Prozent geben Aufschluss über den Grad der Identität zwischen den Primärsequenzen beider Proteine und zwischen den jeweiligen Zinkfingerdomänen. Alle anderen Zahlen repräsentieren die Aminosäurepositionen der Domänengrenzen. SR, Serin-reiche Region; Zn, Zinkfinger; SD, saure Domäne; H, Histidin-reiche Domäne; GR, Glycin-reiche Domäne (modifiziert nach Nguyen *et al.*, 2004).

EMSA-Untersuchungen zur Identifizierung der DNA-Bindungsstelle von YY2 bestätigten, dass die hoch konservierte Zinkfingerdomäne dieses Faktors spezifisch an eine YY1-Konsensussequenz binden kann. Darüber hinaus wurde eine DNA-Bindung an verschiedene Promotorsequenzen, von denen bereits gezeigt wurde, dass sie mit YY1 interagieren, beobachtet. Interessanterweise konnte jedoch nicht für alle getesteten Promotor-assoziierten YY1-DNA-Erkennungsregionen auch eine YY2-Bindung beobachtet werden. Daher wird angenommen, dass neben dem *core* YY1-Motiv weitere DNA-Sequenzen die YY2-DNA-Wechselwirkung bestimmen. Die Kartierung weiterer funktionell relevanter Regionen anhand der Primärsequenz von YY2 offenbarte bisher neben der Zinkfingerdomäne (aa 256-365) nur einen Serin-reichen Bereich zwischen den Aminosäuren 122-163. Proteine mit einer derartigen Region sind in der Natur weit verbreitet. Solche Domänen bergen dabei eine hohe funktionelle

Varianz. Durch weiterführende Deletionsanalysen konnte zudem gezeigt werden, dass YY2 sowohl transkriptionell aktivierende als auch reprimierende Funktionen beinhaltet und damit YY1 vergleichbar ist. Jedoch besitzt YY2 keine saure Domäne, welche die Fähigkeit der transkriptionellen Aktivierung signifikant zu verstärken vermag. Diese Beobachtung legt nahe, dass sich die Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung beider Proteine voneinander unterscheiden. Es wird angenommen, dass wie bei YY1 (Yao *et al.*, 2001) die unterschiedlichen Regulationseffekte bezüglich der Transkription Promotor- bzw. konzentrationsabhängig sind oder sogar durch andere Transkriptionsfaktoren, beispielsweise YY1, beeinflusst werden können.

3.1.3 Nachweis der DNA-Einzelstrang-bindenden Faktoren der PUR-Proteinfamilie

Die spezifische DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren der PUR-Proteinfamilie am Rande der destabilisierten Region HS3 (vgl. Abb. 2.7) wurde während dieser Arbeit eher zufällig entdeckt. Augenscheinlich trat zunächst nur der signifikante Protein-DNA Komplex, bestehend aus der verkürzten EMSA26re-Sonde (sE26re) und dem Faktor B, hervor (Abb. 2.10). Erst die Verwendung von nicht radioaktiv-markierten DNA-Einzelstrang Kompetitoren, zur Überprüfung der Affinität und Spezifität dieser Interaktion anhand von EMSA-Untersuchungen, resultierte in einer deutlichen Reduktion unspezifischer Protein-DNA *shift*-Signale und offenbarte drei weitere, zuvor überlagerte, spezifische Protein-DNA Komplexe (Abb. 2.11B). Literaturrecherchen bezüglich der DNA-Sequenz der sE26re-Sonde erbrachten daraufhin erste Hinweise auf mögliche DNA-Motive für spezifisch einzelsträngige DNA-bindende Faktoren der PUR-Proteinfamilie. Anschließende analytische Vergleichsstudien mit beschriebenen DNA-Sonden für PUR-Proteine und EMSA-*supershift* Experimente bewiesen die Existenz von einem PUR- α und zwei PUR- β vermittelten Protein-DNA Komplexen (Abb. 2.24 und 2.25). Eine Charakterisierung des ursprünglich identifizierten Faktor B blieb bis *dato* erfolglos. Die zuvor erwähnte EMSA-*supershift* Untersuchung und die in Abbildung 2.12 gezeigte Mutationsanalyse der sE26re DNA-Sequenz deuten aber auf eine PUR- α bzw. PUR- β unabhängige und spezifische Protein-DNA Wechselwirkung hin, der ein besonders komplexes DNA-Erkennungselement zugrunde zu liegen scheint.

Die PUR-Proteinfamilie zählt gegenwärtig drei verschiedene Mitglieder, welche sich dadurch auszeichnen, dass sie spezifisch mit einer Purin-reichen (PUR) einzelsträngigen DNA-Erkennungssequenz, bestehend aus GGN-*repeats* (N = A, T oder C), interagieren können (Bergemann und Johnson, 1992; Bergemann *et al.*, 1992). Derartige PUR-Elemente sind in unterschiedlichen eukaryontischen ori (*origin of replication*)-Bereichen und verschiedenen flankierenden Genregionen gefunden worden und haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die DNA-Replikation und Transkription (Haas *et al.*, 1995a; Bergemann und Johnson, 1992; Bergemann *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1994; Jurk *et al.*, 1996; Du *et al.*, 1997). Somit haben die PUR-Proteine funktionelle Relevanz bei der Zellproliferation, der Differenzierung, der Apoptose sowie der Zell-spezifischen Genregulation (Gupta *et al.*, 2003). Zambrano *et al.* (1997) zeigten bei Studien am Neuron-spezifischen FE65 Genpromotor zudem eine bisher

schwer erfassbare schwache DNA-Bindungsaktivität von PUR- α bezüglich doppelsträngiger DNA. Ein derartiger Unterschied in der DNA-Bindungsspezifität offenbart für PUR-Proteine das Zugrundeliegen verschiedener regulatorischer Kontrollmechanismen. Eventuell hat PUR- α bei der Interaktion mit doppelsträngiger DNA einen Helix-destabilisierenden Einfluss, welcher einzelsträngige DNA-Bereiche freilegt. Ein solches Modell erscheint hinsichtlich des erhöhten Strangtrennungspotentials der HS3-Region plausibel. Neben dem am besten untersuchten PUR- α wurden bisher PUR- β (71 % Sequenzidentität zwischen Mensch und Maus) und PUR- γ (54 %) beschrieben, wobei für letzteres lediglich ein cDNA-Eintrag in die Gen-Datenbank (AF195513) und eine daraus abgeleitete Proteinsequenz zugänglich sind (Gallia *et al.*, 2000).

Seit der ersten Klonierung von PUR- α im Jahre 1992 (Bergemann *et al.*, 1992) wurden in einer Vielzahl unterschiedlicher Labore das PUR- α Gen erneut kloniert und jeweils unter anderem Namen veröffentlicht: *myelin enhancing factor 1* (MEF-1, Haas *et al.*, 1995b), *single-stranded cAMP response element-binding protein* (ssCRE-BP, Osugi *et al.*, 1996), *specific single-stranded DNA-binding factor 1* (SPSF1, Haas *et al.*, 1993), *BI and BII FE65 promoter complexes* (Zambrano *et al.*, 1997), *neuronal nicotinic acetylcholine receptor promoter-binding protein 43* (NARP43, Chang *et al.*, 1996) *vascular actin single-stranded DNA-binding factor 2* oder *p46 component* (VACssBF2, Kelm *et al.*, 1997) und *(CAG)-element-recognizing protein 1* (CAGER-1, Yano *et al.*, 1999). Die Struktur des ubiquitär exprimierten 322 Aminosäuren umfassenden humanen Proteins (321 Aminosäuren bei Maus) birgt eine zentral gelegene, für die Bindung von einzelsträngiger DNA wichtige Region (Chen *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1995). Sie besteht aus drei basisch aromatischen Klasse I *repeats*, welche alternierend durch saure Leucin-reiche Klasse II *repeats* (insgesamt zwei) unterbrochen sind (Gallia *et al.*, 2000). Für die gesamte Domäne konnte außerdem eine spezifische Wechselwirkung mit RNA nachgewiesen werden, resultierend in einer reduzierten (Tretiakova *et al.*, 1998) bzw. erhöhten (Herault *et al.*, 1995) DNA-Bindungsaktivität oder einer transkriptionellen Genaktivierung bei HIV-1 (Chepenik *et al.*, 1998; Gallia *et al.*, 1999b). Die Gegenwart von RNA ist ebenso bei der Selbstassoziation von PUR- α von entscheidender Bedeutung (Gallia *et al.*, 1999a). Darüber hinaus beinhaltet dieser Bereich neben der Oligomerisierungsdomäne (Gallia *et al.*, 1999a) essentielle Sequenzabschnitte, welche Interaktionen mit verschiedenen regulatorischen Proteinen, wie T-Antigen und dem YB-1 Protein (Gallia, *et al.*, 1998; Safak *et al.*, 1999), vermitteln. Weitere strukturelle Merkmale sind eine am N-Terminus lokalisierte Glycin-reiche Region mit 18 aufeinander folgenden Glycinen, welche durch einen einzelnen Serinrest unterbrochen wird. Weiterhin dient ein so genanntes *psycho*-Motiv (aa 251-278; Ma *et al.*, 1994) der Wechselwirkung mit der hypophosphorylierten Form des Retinoblastoma Protein (pRb, Johnson *et al.*, 1995), wohingegen der C-Terminus eine Glutamin/Glutamat-reiche Domäne aufweist. Es wird angenommen, dass solche Glutamin-reichen Sequenzen, hier durch sieben aufeinander folgende Glutaminreste gekennzeichnet (Q₇), als transkriptionelle Aktivierungsdomänen fungieren (Tijan und Maniatis, 1994) und eine transkriptionelle Transaktivator Funktion von PUR- α ist bei verschiedenen Genen bereits gezeigt worden (Chen und Khalili, 1995; Haas *et al.*, 1995b; Zambrano *et al.*, 1997).

Murines PUR- β besteht aus 324 Aminosäuren und weist eine vergleichbare Modellstruktur wie PUR- α auf. Jedoch existieren verschiedene erwähnenswerte Unterschiede zwischen beiden PUR-Proteinen. PUR- β enthält neben einer veränderten Glycin-reichen Domäne am N-Terminus einen zusätzlichen Glycin-reichen Sequenzabschnitt innerhalb der DNA-bindenden Domäne. Darüber hinaus fehlt die Glutamin-reiche Region am C-Terminus (Gallia *et al.*, 2000). Phylogenetisch betrachtet, konnte die hoch konservierte PUR- α Sequenz bei einer großen Anzahl unterschiedlicher Organismen identifiziert werden. Neben Mensch und Maus, deren Primärsequenzen sich lediglich in zwei Aminosäuren unterscheiden, konnten entsprechende Gene auch bei den Invertebraten *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Schistosoma mansoni* und im Pflanzenreich bei *Arabidopsis thaliana* gefunden werden, deren höchste Homologie sich vor allem im Nukleinsäure-bindenden Bereich zeigt.

Eine Beteiligung von PUR- α an der transkriptionellen Kontrolle verschiedener zellulärer und viraler Gene konnte bereits gezeigt werden. Während PUR- α beispielsweise die Transkription des zellulären MBP (*myelin basic protein*) Promotors stimuliert (Haas *et al.*, 1995b; Tretiakova *et al.*, 1999), wird der VSM (*vascular smooth muscle*) α -Aktin Promotor reprimiert (Sun *et al.*, 1995; Kelm *et al.*, 1996). Interessanterweise sind für die Repression des VSM α -Aktin Promotors zwei Faktoren (p46 und p44) notwendig und ausreichend. p46 entspricht dabei PUR- α , während es sich bei p44 um PUR- β handelt (Kelm *et al.*, 1997). Weitere Untersuchungen konnten beweisen, dass beide Proteine miteinander interagieren und dabei Homo- oder Heterodimere ausbilden können (Kelm *et al.*, 1999a). Transkriptionsstudien am α -MHC (*myosin heavy chain*) Gen unter Beteiligung von PUR- α und PUR- β legen nahe, dass PUR- α als transkriptioneller Aktivator fungiert, während der kombinatorische Effekt von PUR- α/β eine Repression des α -MHC Gens zur Folge hat (Gupta *et al.*, 2003). Die funktionelle Signifikanz von PUR- α Homodimerkomplexen scheint sich erheblich von PUR- β Homodimeren bzw. PUR- α/β Heterodimeren zu unterscheiden. Eine entscheidende Voraussetzung hierfür bieten die bereits oben erwähnten strukturellen Unterschiede zwischen murinem PUR- α und PUR- β (Gallia *et al.*, 2000). Da die Glutamin-reiche Q₇-Region von PUR- α in Verbindung mit transkriptionellen Aktivierungsdomänen steht (Tijan und Maniatis, 1994), könnte das Fehlen einer Q₇-Sequenz zusammen mit weiteren Unterschieden im C-terminalen Bereich von PUR- β die Repressoreigenschaft dieses Transkriptionsfaktors erklären. Möglicherweise besteht ein antagonistisches Verhältnis, bezüglich kompetitiver ssDNA-Bindung, zwischen PUR- α vermittelter Transkriptionsaktivierung und PUR- β assoziierter Repression (Kelm *et al.*, 1997). Untersuchungen von Protein-Protein Interaktionen der PUR-Proteine deuten auf eine weitere, die DNA-Bindungseigenschaften beeinflussende, Regulationsebene hin. Während sich die Wechselwirkung mit den Faktoren E2F-1, Cyclin A und den bereits aufgeführten Proteinen pRB und YB-1 abschwächend auf die DNA-Bindung der PUR-Proteine auswirkt (Chen *et al.*, 1995, Johnson *et al.*, 1995; Darbinian *et al.*, 1999), verstärkt die Assoziation von Ca²⁺/Calmodulin die DNA-Bindungsaktivität (Kuo *et al.*, 1999). Generell stellt die PUR-Protein-vermittelte transkriptionelle Regulation einen sehr komplexen Mechanismus dar. Von entscheidender Bedeutung dürfte sein, wann und unter welchen

Bedingungen welche Form (Monomer, Homo- bzw. Heterodimer) mit oder ohne akzesorischem Protein- oder RNA-Besatz an die entsprechenden DNA-Motive bindet und die jeweils entscheidenden Zielgene aktiviert bzw. inhibiert.

3.1.4 Nachweis des POU-Domänen Transkriptionsfaktors Oct-1

Neben DNA-Erkennungsmotiven für die Transkriptionsfaktoren der PUR-Proteinfamilie konnten für die Promotor-proximale Region HS3 vier unterschiedlich stark degenerierte DNA-Bindungsstellen für Oct-1 identifiziert werden (Stellamanns, 2005). Darüber hinaus konnten zusätzliche Oct-1 Motive innerhalb des Kontrollbereichs der IFNB1-Domäne anhand von Sequenzvergleichen vorhergesagt werden. Interessanterweise war demnach eines direkt innerhalb der regulatorischen Region des IFN- β Promotors lokalisiert, wohingegen sich das zweite überlappend mit der DNA-Bindungsstelle für YY-Proteine im destabilisierten Bereich HS2 befand. Für beide postulierten Oct-1 Motive konnte im Rahmen dieser Arbeit eine spezifische Protein-DNA Interaktion nachgewiesen werden (vgl. Abb. 2.23).

Das multifunktionelle Protein Oct-1, welches zur Familie der POU (Pit-1, Oct-1, UNC-86)-Domänen Transkriptionsfaktoren gehört (Verrijzer und Van der Vliet, 1993), ist wahrscheinlich bei allen proliferierenden eukaryontischen Zellen zu finden. Da Oct-1 ubiquitär exprimiert wird und DNA-Bindungsstellen an den Promotoren für das Histon H2B-Gen (Hinkley und Perry; 1992; Fletcher *et al.*, 1987) und den Genen für die snRNAs U2, U6 und 7SK (Ryan und Rosenfeld, 1997; Phillips und Luisi, 2000; Yang *et al.*, 1991; Kunkell und Pederson, 1988; Janson *et al.*, 1989; Strom *et al.*, 1996) aufweist, wird angenommen, dass es als konstitutiver Transkriptionsfaktor die Expression dieser *housekeeping* Gene reguliert. Jedoch ist mittlerweile bekannt, dass Oct-1 ein vielfältigeres und komplexeres Wirkungsspektrum besitzt. Neben den *housekeeping* Genen werden darüber hinaus eine Vielzahl von gewebespezifischen Genen Oct-1 reguliert, wie beispielsweise Interleukin (IL)-2 (Ullman *et al.*, 1991), IL-8 (Wu *et al.*, 1997) IL-3 und IL-5, die Immunglobuline α (Malone *et al.*, 2000a), β (Malone *et al.*, 2000b), Ly9 (Tovar *et al.*, 2000) und viele andere (Sytina und Pankratova, 2003). Oct-1 besitzt, ähnlich wie YY1/YY2, eine duale Aktivität. Während es in einigen Fällen als transkriptioneller Aktivator fungiert, unterdrückt es in anderen die Transkription. Ferner ist Oct-1 an der Replikation von Adenoviren (Kim *et al.*, 1996) und wahrscheinlich auch eukaryontischer Genome beteiligt. Interessanterweise ist Oct-1 auch beim Anheften von Chromatinschlaufen an der nukleären Matrix, sowie der Ausbildung (Funktion) von S/MARs beteiligt (Pruijn *et al.*, 1988; Imai *et al.*, 1997), was durch die hier gezeigte Koinzidenz von funktionellen Oct-1 DNA-Bindungsstellen und destabilisierten DNA-Bereichen unterstrichen wird. Aufgrund vieler unabhängiger Studien wird Oct-1 zudem mit Apoptose und embryonaler Entwicklung in Verbindung gebracht (Veenstra *et al.*, 1995, 1997 und 1998; He *et al.*, 1989).

Der Mechanismus dieser funktionellen Wirkungsvielfalt von Oct-1 geht auf eine Reihe unterschiedlicher Eigenschaften dieses Proteins zurück. Besonderes Augenmerk gilt dabei dessen strukturellen Merkmalen und der Vielzahl an möglichen DNA-Motiven, mit denen Oct-1 interagieren kann. Der POU-Transkriptionsfaktor Oct-1 weist von Invertebraten

bis hin zum Menschen eine erstaunlich hohe speziesübergreifende Homologie auf (Sytina und Pankratova, 2003). Wie die meisten Mitglieder der POU-Familie, besitzt Oct-1 die sehr hoch konservierte POU-Domäne zur DNA-Erkennung. Die POU-Domäne besteht aus zwei Subdomänen: eine aus 75 Aminosäuren zusammengesetzte spezifische POU-Domäne (POU_S) mit vier α -helikalen Bereichen und eine etwas kleinere aus drei α -Helices bestehende POU-Homeodomäne (POU_{HD}, aa 60) sind dabei über eine Linkersequenz miteinander verbundenen (Ryan und Rosenfeld, 1997; Phillips und Luisi, 2000). Beide Subdomänen sind strukturell autonom und besitzen jeweils ihre eigene DNA-Spezifität. Jedoch besitzt jede einzelne eine deutlich geringere DNA-Affinität als die gesamte POU-Domäne (Verrijzer *et al.*, 1992). Es ist bekannt, dass Oct-1 ein breites Spektrum an degenerierten A/T-reichen DNA-Bindungsstellen erkennt, indem es spezifisch mit flankierenden Sequenzen interagiert (Baumruker *et al.*, 1988). Die höchste Affinität der POU-Domäne von Oct-1 wurde dabei für die DNA-Sequenz 5'-ATTTGCAT-3' beschrieben (Verrijzer *et al.*, 1992; Stepchenko, 1992, 1994; Stepchenko *et al.*, 1997a und 1997b; O'Hare und Goding, 1988). Die Ursache für diese hohe Variabilität der DNA-Motive liegt in den bereits erwähnten strukturellen Merkmalen der flexiblen POU-Domäne begründet. Es wird angenommen, dass diese überaus dynamische Struktur die spezifische, je nach Promotor unterschiedliche, transkriptionelle Aktivität von Oct-1 bestimmt. Dabei zieht die Interaktion mit verschiedenen gearteten DNA-Bindungsstellen leichte Konformationsänderungen der POU-Domäne nach sich und beeinflusst so nachhaltig die Wechselwirkung mit anderen nukleären Proteinen. Die DNA-Sequenz dient dabei als eine Art allosterischer Modulator, indem sie spezielle Oberflächenregionen von Oct-1 für die Assoziation von anderen Transkriptionsfaktoren oder spezifischen Koaktivatoren generiert. Dieser Mechanismus ist von außerordentlicher Bedeutung für die entsprechenden regulatorischen Effekte von Oct-1 auf das jeweilige Zielgen (Gstaiger *et al.*, 1996; Sauter und Matthias, 1998; Cepek *et al.*, 1996; Babb *et al.*, 1997; Lefstin und Jamamoto, 1998; Chandaran *et al.*, 1996 und 1999). Neben der Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen stellt alternatives *splicing* der mRNA eine weitere Regulationsebene für die Wirkungsweise von Oct-1 dar. Außerdem spielt noch der Phosphorylierungsgrad von Oct-1 und dessen Bindung an die nukleäre Matrix bzw. *high mobility group* (HMG) Proteine während des Zellzyklus eine entscheidende Rolle (Sytina und Pankratova, 2003).

3.2 Beteiligung der identifizierten Proteine YY1 und YY2 an der Regulation des humanen IFN- β Promotors

Der Mechanismus der transkriptionellen Regulation des humanen IFNB1 Gens wird seit vielen Jahren ausführlich untersucht. Virus-induzierte Expression von humanem IFN- β veranschaulicht dabei in einer beeindruckenden Art und Weise das Prinzip kooperativer DNA-Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren und liefert wertvolle Einblicke in die beteiligten Mechanismen transienter Genexpression bei multizellulären Organismen (Carey, 1998; Maniatis *et al.*, 1998). Historisch betrachtet wurde versucht, den für die Virusinduktion relevanten regulatorischen Bereich des IFN- β Promotors, anhand eines klonierungstechnisch auf 350 bp beschränkten genomischen Promotorfragments aus der IFNB1-Domäne,

sukzessive einzuengen. Dabei wurde nahegelegt, dass die gesamte Information, welche für die Virus-induzierbare IFN- β Expression benötigt wird, innerhalb eines etwa 55 bp umfassenden *enhancer*-Elements zwischen den Positionen -110 und -55 (relativ zum Transkriptionsstart), im so genannten *virus response element* (VRE), lokalisiert ist (Maniatis *et al.*, 1992). Innerhalb dieser Sequenz werden direkt nach der Induktion zahlreiche verschiedene Faktoren rekrutiert, welche in ihrer Gesamtheit das bereits in der Einleitung erwähnte *enhanceosome* ausbilden. Jedoch zeigten schon früher durchgeführte Untersuchungen zur Regulationseinheit des humanen IFNB1 Gens, dass die Ereignisse am VRE nicht ausreichen, um die Induktion und Expression vollständig zu verstehen. Die Transfektion eines 36 kb umfassenden genomischen Bereichs der humanen IFNB1-Domäne führte in einem heterologen Zellsystem (murine LTK-Zellen) zu wesentlich höheren und konsistenteren Expressionswerten, verglichen mit entsprechenden Minimalkonstrukten (Hauser *et al.*, 1982). Bestätigt wurde diese Beobachtung auch mit kürzeren genomischen DNA-Bereichen aus *upstream*- und *downstream*-Regionen der humanen IFNB1-Domäne (Klehr, 1991). Auch in Abbildung 2.16 wurde gezeigt, dass die Induzierbarkeit/Aktivität des IFN- β Promotors in Gegenwart des etwa 5 kb großen *upstream*-Kontrollbereichs um den Faktor 2 steigt.

Bisherige Studien zur Bestimmung eines an der Regulation der IFN- β Expression beteiligten Proteinbesatzes, aufgrund von DNase I-hypersensitiven Stellen im Bereich der humanen IFNB1-Domäne, zeigten bereits, dass die in Abbildung 1.1 destabilisierten Bereiche HS2 und HS3 als Positionierungssignale für Nukleosomen fungieren (Bode *et al.*, 1986). Dabei korreliert der Nukleosomen-Besatz mit weniger stark destabilisierten Arealen im SIDD-Profil. Das Verschwinden eines an die HS2-Region angrenzenden Nukleosoms während der Geninduktion deutet darüber hinaus auf die regulatorische Signifikanz dieser Region hin. Ein weiteres, mehr zentral zwischen den beiden destabilisierten Bereichen gelegenes Nukleosom zeigt hingegen eine Induktions-unabhängige, konstitutive DNA-Assoziation. In einer späteren Studie konnte die Lage nukleosomaler Positionierungssignale abgeleitet werden (Bode *et al.*, 2000b). Zwei zusätzlich relevante nukleosomale Positionierungssignale konnten auch direkt für die Promotorregion, an VRE-flankierenden Stellen -268 bis -118 (Nukleosom 1) und -15 bis +132 (Nukleosom 2), identifiziert werden (Agalioti *et al.*, 2000). Letzteres maskiert im Ruhezustand die TATA-Box und den Transkriptionsstart. Nach Induktion wird es durch Ausbildung des *enhanceosome* signifikant modifiziert und dient der Rekrutierung weiterer, für die Aktivierung der Transkription essentieller, Faktoren.

Auf die Existenz weiterer regulatorisch bedeutender DNA-Elemente deutete die Korrelation von dominant destabilisierten DNA-Bereichen des SIDD-Algorithmus mit biochemisch verifizierten DNase I-hypersensitiven Stellen hin (Ernst, 2000). Wie bereits beschrieben, konnten zahlreiche spezifisch einzel- oder doppelsträngige DNA bindende Faktoren innerhalb der *upstream*-Kontrollregion der IFNB1-Domäne identifiziert werden. Substitutionsexperimente einzelner DNA-Bindungsplätze unterstrichen dabei die Bedeutung dieser DNase I-hypersensitiven Stellen für die Induzierbarkeit des IFNB1 Gens.

Eingehende Untersuchungen bezüglich eines transkriptionellen Einflusses auf den IFN- β Promotor erfolgten am Beispiel der flankierenden YY1/YY2 DNA-Motive der destabi-

bilisierten Regionen HS1 und HS2 (vgl. Abb. 2.13). Zwar wurde hier nur für die HS2-assoziierte DNA-Bindungsstelle eine direkte Interaktion mit YY1 und YY2 nachgewiesen (Abb. 2.21 und 2.22.), doch die Sequenzhomologie beider DNA-Elemente deutet auf eine identische Protein-DNA Wechselwirkung hin. Bereits die Mutation einer dieser beiden YY1/YY2-Motive führte zu einer 4-5-fach verminderten Induzierbarkeit des humanen IFN- β Promotors bei stabil integrierten Reportergenkonstrukten, wohingegen der nicht-induzierte Zustand keine Veränderungen aufwies (Abb. 2.18). Die vergleichbare Reduktion der Promotorinduktion der Zweifachmutante impliziert, dass beide YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen gleichwertig an der Induktion des humanen IFN- β Promotors beteiligt sind (Abb. 2.18). Dass hierbei die Reportergenaktivität des Minimalpromotorkonstrukts (P) stärker als bei den YY1/YY2-Motiv Mutanten ausfällt, kann mit der entarteten Natur des, aus dem genomischen Kontext herausgenommenen, IFN- β Promotors zusammenhängen. Anschließende Überexpressionsstudien beider Proteine an entsprechenden Wildtyp-Reportergenkonstrukten resultierten im Falle des YY1-Proteins in einer erhöhten Basalaktivität (Derepression) des IFN- β Promotors und in einem vollständigen Verlust der Induzierbarkeit (Abb. 2.26). Repressorische Effekte auf die Transkription durch transient überexprimiertes YY1 konnte bereits für verschiedene zelluläre Gene, wie beispielsweise des skelettalen α -Aktin (Lee *et al.*, 1992), β -Casein (Meier und Groner, 1994; Raught *et al.*, 1994), ε -Globin (Raich *et al.*, 1995), γ -IFN (Ye *et al.*, 1996) und c-Fos (Gualberto *et al.*, 1992; Natesan und Gilman, 1993) gezeigt werden. Transient überexprimiertes YY2 hingegen zeigte keine Auswirkung auf die Reportergenaktivität des Wildtypkonstrukts (Abb. 2.26 und 2.27). Diese Beobachtungen wiesen auf einen kompetitiven Effekt in Bezug auf die YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen hin, welcher durch Kotransfektion beider Expressionsplasmide im molaren Verhältnis 1:5 (YY1:YY2) nahezu vollständig aufgehoben werden konnte (Abb. 2.27). Da die beschriebene Beobachtung auf stabil transfizierte Mauszellen zurückgeht, müsste ein dem humanen YY2 funktionell ähnliches Protein auch bei Mäusen zu finden sein, um den kompetitiven Einfluss von transient überexprimiertem YY1 zu erklären. Das Ergebnis des Kotransfektionsexperiments hat eindrucksvoll gezeigt, dass YY2 maßgeblich den Induktionsprozess des humanen IFN- β Promotors wiederherzustellen vermag. Eine ebenfalls transkriptionell aktivierende Wirkungsweise von YY2 konnte bereits für den c-Fos Promotor beschrieben werden (Nguyen *et al.*, 2004). Möglicherweise zeichnet sich der Gesamtregulationsmechanismus von c-Fos und IFN- β Promotor durch einen streng regulierten Antagonismus von YY1 und YY2 DNA-Bindung aus.

Da keine weiteren funktionellen YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen innerhalb der untersuchten Kontrollregion gefunden werden konnten, sind die vorliegenden Beobachtungen bezüglich der Überexpression von YY1 und YY2 ausschließlich auf die beiden charakterisierten YY1/YY2-Motiven der Regionen HS1 und HS2 zurückzuführen. Erste *chromatin immunoprecipitation* (ChIP)-Analysen der Region HS2 deuten auf eine direkte Interaktion beider Proteine hin (Abb. 2.32). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der in diesen Experimenten eingesetzte anti-YY1 Antikörper mit nativem YY2 kreuzreagiert. Daher muss

dieses Ergebnis, um deutlichere Aussagen treffen zu können, mit anderen Antikörpern, welche ausschließlich YY1 erkennen können, verifiziert werden.

Ein Reporter-genkonstrukt, welches im Vergleich zu dem in dieser Arbeit eingesetzten P + EcoC-Konstrukt, eine invertierte *upstream*-Kontrollregion der humanen IFNB1-Domäne, mit Ausnahme des Promotorbereichs, beinhaltet, wies eine dem P + EcoC-Konstrukt äquivalente Reporter-genaktivität auf (Stellamanns, 2005). Dieser Befund deutet auf eine *enhancer*-typische orientierungs- und positionsunabhängige Funktionsweise (Atchison, 1988) der an der Induktion des IFN- β Promotors beteiligten Transkriptionsfaktoren hin. Die hier identifizierten Affinitäten beider YY-Proteine werden bisher nur für die nicht-induzierbaren Promotorbereiche der Gene p53, c-Myc, CXCR4, GMCSF und wie bereits aufgeführt c-Fos beschrieben (Nguyen *et al.*, 2004). Die Beteiligung des "Histon Codes", d.h. einer gezielten Wirkung von Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) am Typ I-Interferon Induktionsmechanismus ist mittlerweile allgemein akzeptiert (Munshi *et al.*, 1999; Agaloti *et al.*, 2002). Protein-Protein Interaktionsstudien von YY1 haben bestätigt, dass YY1 sowohl mit den bekannten HATs p300 (Lee *et al.*, 1995a), CBP (*CREB-binding protein*; Austen *et al.*, 1997), PCAF (*p300-CBP associated factor*; Yao *et al.*, 2001) und auch den HDACs 1-3 (Yang *et al.*, 1996 und 1997) assoziieren kann. Daher ist es durchaus denkbar, dass YY1 durch selektive Interaktion mit HATs oder HDACs zum Aktivator oder Repressor werden kann. Im Jahr 2003 zeigten Weill *et al.* erstmals eine Beteiligung von YY1 an der IFN- β Regulation der Maus. Überexpression von YY1 in murinen L929-Zellen führte sowohl bei stabil integrierten Reporter-genkonstrukten des IFN- β Promotors als auch beim endogenen IFN- β Gen zu einer starken Repression der transkriptionellen Aktivität via eines HDAC-vermittelten Mechanismus. Ein vergleichbar repressorischer Einfluss von überexprimiertem YY1 auf den endogenen IFN- β Promotor konnte in dieser Arbeit auch für humane MG63-Zellen beobachtet werden (Abb. 2.31). Weill und Mitarbeiter identifizierten anhand von *in vitro* und *in vivo* Experimenten zwei spezifische YY1 DNA-Bindungsstellen im proximalen IFN- β Promotorbereich an den Positionen -122 und -90 (relativ zum Transkriptionsstart). Verglichen mit dem in dieser Arbeit beschriebenen YY1/YY2 DNA-Motiv sE7 zeigt die murine Erkennungssequenz bei -90 eine deutlich geringere Affinität für YY1 (vgl. Abb. 2.28A). Mutationsstudien der beiden Promotor-assoziierten murinen YY1-Elemente unterstrichen ihre Relevanz für die transkriptionelle Regulation des IFN- β Gens (Weill *et al.*, 2003). Während der Austausch bei -90 nahezu vollständig die Fähigkeit von YY1 aufhob, die transkriptionelle Aktivität des IFN- β Promotors zu reprimieren, wurde im Gegensatz dazu die YY1-vermittelte Repression zumindest teilweise bei der Mutation an Position -122 fortgesetzt. Beide Einzelmutationen bewirken zudem, vergleichbar der entsprechenden Doppelmutante, eine verminderte Induzierbarkeit des IFN- β Promotors, welche kurz nach Virusinduktion startet.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit auch erstmals eine Interaktion von humanem YY2 mit dem murinen YY1 DNA-Motiv (-90) gezeigt werden (Abb. 2.28B). Auffällig ist zudem, dass, vergleichbar YY1, ein signifikanter Affinitätsunterschied zugunsten der humanen sE7 DNA-Sequenz besteht. Die beobachtete Wechselwirkung zwischen hu-

manem YY2 und der murinen YY1 DNA-Bindungsstelle legt nahe, dass ein dem humanen YY2 homologes Protein der Maus durchaus auch am Regulationsmechanismus der murinen IFN- β Expression beteiligt sein könnte.

Es wird angenommen, dass die HAT Gcn5, welche zur Familie der PCAF-Proteine gehört, essentiell für die Virus-induzierte transkriptionelle Aktivierung des IFN- β Promotors ist. Denn es konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Gcn5 an den humanen IFN- β Promotor drei Stunden nach der Infektion beginnt, nach weiteren drei Stunden ein Maximum erreicht und nach insgesamt neun Stunden eine Dissoziation des Faktors Gcn5 einsetzt (Agalioti *et al.*, 2000). Der/die verantwortliche(n) Faktor(en) für das Rekrutieren von Gcn5 an den IFN- β Promotor konnten bisher nicht identifiziert werden. Weill *et al.* (2003) schlagen jedoch vor, dass YY1 während der Rekrutierung von Gcn5 eine entscheidende Rolle spielt und somit kurz nach der Infektion als transkriptioneller Aktivator fungiert. Somit besäße YY1 bei der Regulation der murinen IFN- β Expression eine duale Funktion als zentrales Schaltelement. Während es den nicht-induzierten Zustand durch Rekrutierung von HDACs aufrechterhält, könnte es über eine Protein-Protein Wechselwirkung mit der HAT Gcn5 maßgeblich zu der Aktivierung des murinen IFN- β Promotor beitragen.

Interessanterweise postulierten Weill und Mitarbeiter auch eine potentielle YY1 DNA-Erkennungssequenz im humanen IFN- β Promotorbereich und legten somit ein konserviertes Regulationsprinzip des IFN- β Promotors bei Maus und Mensch nahe. Jedoch konnten hierzu durchgeführte Untersuchungen kein funktionelles YY1-Motiv innerhalb der humanen Promotorregion bestätigen (Abb. 2.28A und 2.29).

In dieser Arbeit konnte indessen anhand von Substitutionsexperimenten gezeigt werden, dass die *far-upstream* vom humanen IFN- β Promotor lokalisierten YY1/YY2 DNA-Bindungsstellen der Regionen HS1 und HS2 (rote Pfeile, Abb. 2.13) von entscheidender Bedeutung für die Induktion der IFN- β Expression, vergleichbar den oben erwähnten murinen YY1-Motiven, sind (Abb. 2.15, 2.16 und 2.18). Möglicherweise steht auch hier die Assoziation von YY1 bzw. YY2 an die entsprechenden DNA-Motive mit einer Rekrutierung von HDACs oder HATs in direkter Verbindung. Die Interaktion mit diesen Chromatin-modifizierenden Proteinen könnte strukturelle Veränderungen der humanen IFNB1-Domäne nach sich ziehen und somit von essentieller Bedeutung für den Induktionsprozess der humanen IFN- β Expression sein.

Die Entdeckung von YY2 fügte eine neue Ebene der Komplexität bezüglich der Regulation von Genen, welche YY1-Bindungsstellen beinhalten, hinzu. Einhergehend mit der sequenzspezifisch nahe verwandten DNA-Erkennung von YY1 und YY2 stellen sich einige weiterführende Fragen:

- Wie viele der bisher YY1-zugeordneten Effekte bei verschiedenen Genen sind tatsächlich YY2 reguliert ?

- Wie viele der ursprünglich als „reine“ YY1-Motive bezeichneten DNA Bindungsstellen können von YY2 erkannt werden ?
- Welche DNA-Sequenz determiniert eine YY1/YY2 DNA-Bindungsstelle ?
- Existieren auch ausschließlich YY2-spezifische DNA-Erkennungssequenzen ?

Abgesehen von den Positionen der Aktivierungs- bzw. Repressionsdomänen (Nguyen *et al.*, 2004), ist die Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von entscheidender Bedeutung für das funktionelle Verständnis von YY2, da diesbezüglich bisher nur vage Vermutungen gemacht werden können.

3.3 Vergleichende Analyse der SIDD-Profile von Mensch und Maus

Ein Teilaspekt, der in dieser Arbeit beleuchtet werden sollte, betraf die Übertragbarkeit der biochemischen Daten der humanen IFNB1-Domäne auf den entsprechenden murinen Sequenzabschnitt. Wie in Abbildung 2.14 gezeigt, konnten auch innerhalb der murinen Kontrollregion SIDD-Minima-assoziierte, funktionelle DNA-Motive für die Transkriptionsfaktoren der YY-Proteinfamilie identifiziert werden. Jedoch wurde nicht genauer untersucht, ob sowohl YY1 als auch YY2 mit diesen DNA-Bindungsstellen interagieren können. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass zumindest YY1 spezifisch mit diesen DNA-Bereichen assoziiert, da bisher keine ausschließlich YY2-spezifischen DNA-Erkennungsmotive beschrieben worden sind. Interessanterweise zeigen die beiden murinen DNA-Bindungsstellen eine mit den humanen YY1/YY2 DNA-Motiven relativ vergleichbare, Positionierung im untersuchten Kontrollbereich (grüne Pfeile, Abb. 2.13). Außer dem Abstand, den beide DNA-Motive zueinander aufweisen, ist auch die Distanz zu der Promotorregion des jeweiligen IFNB1 Gens relativ ähnlich. Ob auch die beschriebenen murinen DNA-Bereiche an der Regulation des IFN- β Promotors beteiligt sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Möglicherweise gelten aber auch für die IFNB1-Domänen von Mensch und Maus vergleichbare Merkmale, wie sie bei SIDD-Profil Untersuchungen an den Promotoren der humanen und murinen *Colla1* Gene beobachtet wurden (Mielke *et al.*, 2002). Zwar zeigen die SIDD-Profile der IFNB1-Domäne, im Vergleich zu den *Colla1* Genen, nur bedingt eine übereinstimmende Positionierung der Haupt-SIDD-Minima, jedoch weisen beide einen vergleichbaren Gesamtdestabilisierungsgrad auf (Abb. 2.13). Analog zu der Arbeit von Mielke und anderen besteht auch bei den Nukleotidsequenzen der destabilisierten Regionen der untersuchten IFNB1-Domänen keine außergewöhnlich hohe Ähnlichkeit zueinander (Mielke *et al.*, 2002). Regionen mit einer erhöhten Sequenzhomologie beschränken sich hauptsächlich auf die kurzen Sequenzabschnitte, für die eine Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren der YY-Proteinfamilie beschrieben werden konnte. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass zwei unterschiedliche Anforderungen an nicht-kodierenden DNA-Sequenzen deren Evolution beeinflussen. Zum Einen muss die Nukleotidsequenz einiger DNA-Stellen erhalten bleiben, um die Ausbildung spezifischer DNA-Protein Interaktionen zu gewährleisten, während an anderen

Stellen nur die Fähigkeit beibehalten bleiben muss, bestimmte Chromatinstrukturen auszubilden. Letzteres hängt dabei nicht strikt von einem hochgradigen Erhalt der primären Nukleotidabfolge, sondern von der Wahrung biochemischer und biophysikalischer Gesamteigenschaften der DNA-Sequenz, ab. Sheridan *et al.* (1998) konnten bei Untersuchungen am prokaryontischen *ilvP_G*-Promotor zeigen, dass eine Interaktion von regulatorischen Proteinen mit einer *upstream* des Promotors lokalisierten spezifischen DNA-Region deren Destabilisierung bewirkt, und diese destabilisierende Eigenschaft aufgrund aufkommender Superhelizität anschließend in Richtung Promotor transferiert werden kann. Dieser Mechanismus, der Protein-vermittelten, Superhelizität-abhängigen Regulation der transkriptionellen Initiation, welcher hier für Prokaryonten beschrieben wurde, könnte auch für Eukaryonten von Bedeutung sein. Im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Benham, 1993 und 1996; Benham *et al.*, 1997; Salimi-Tari *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 1998; Krempen *et al.*, 1999; He *et al.*, 2000; Leblanc *et al.*, 2000) sind destabilisierte Bereiche in SIDD-Profilen ein häufiges und möglicherweise universelles Merkmal von regulatorischen DNA-Elementen, die eine Beteiligung an der Organisation von Chromatinstrukturen, der zellspezifischen transkriptionellen Regulation und der Initiation bzw. Termination der Transkription vermitteln (Mielke *et al.*, 2002).

3.4 Ausblick

Die Menge an Sequenzierungsdaten der Genome verschiedenster Organismen bietet eine reichhaltige Ressource an Informationen aller Art, deren Nutzung aber erst nach und nach erfolgt. Grund hierfür ist/war unter anderem, dass neuartige Ansätze erst entwickelt werden müssen/mussten. Die Identifizierung von zahlreichen kodierenden DNA-Abschnitten mit bis *dato* unbekannten Genen war bisher ein wesentlicher Teilerfolg der Genomanalysen. Mit der Entwicklung geeigneter Computerprogramme, wie des SIDD-Algorithmus, eröffneten sich weitere Möglichkeiten große DNA-Sequenzen in ihrer Gesamtheit auf Strukturmerkmale hin zu untersuchen. Insbesondere die Erleichterung bei der Vorhersage strukturell relevanter DNA-Abschnitte einzelner Gendomanen, wie beispielsweise von S/MAR-Elementen, war und ist von entscheidender Bedeutung für das stetig wachsende Verständnis über die Gesamtorganisation des Chromatins.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstreichen eindrucksvoll, dass das biomathematische Modell des SIDD-Algorithmus auch als Vorhersageprogramm für S/MAR-unabhängige DNA-Bereiche mit regulatorischem Potential, wie zum Beispiel für außerhalb von Promotorbereichen gelegene *silencer*- oder *enhancer*-Elemente, künftig von entscheidender Bedeutung sein könnte. Bisher konnte lediglich in wenigen Studien für bereits charakterisierte Transkriptionsfaktor DNA-Bindungsstellen eine nachträgliche Korrelation mit im SIDD-Profil destabilisierten DNA-Bereichen gezeigt werden. In dieser Arbeit konnten erstmals, am Beispiel eines Kontrollbereichs aus der humanen IFNB1-Domäne, biochemisch spezifische DNA-Erkennungsregionen für die Transkriptionsfaktoren YY1/YY2, PUR- α /PUR- β sowie Oct-1, anhand von SIDD-Minima verifiziert werden. Darüber hinaus wurde zusätzlich eine spezifische DNA-Interaktion eines bisher nicht identifizierbaren Proteins (Faktor B)

ermittelt. Im Falle von YY1 und YY2 ergaben detaillierte Studien an verschiedenen Reporter-genkonstrukten und dem endogenen IFNB1 Gen einen signifikant funktionellen Einfluss beider Proteine bei der Virus-induzierten Aktivierung des humanen IFN- β Promotors. Interessanterweise liegen die DNA-Motive der beiden YY-Proteine dabei mehrere Kilobasen (-2 kb bzw. -3.4 kb) *upstream* vom Promotorbereich entfernt.

Künftige Experimente sollen dazu beitragen, den genauen Regulationsmechanismus der *far-upstream* von humanen IFN- β Promotor lokalisierten YY1/YY2-DNA Interaktion zu erklären. Angedacht sind zunächst neben siRNA-Experimenten auch systematische ChIP-*timecourse*-Studien nach Virusinduktion mit geeigneten Antikörpern. Ob hierbei möglicherweise ein speziessübergreifendes, bei Mensch und Maus konserviertes Regulationsprinzip zugrunde liegt, werden analoge Untersuchungen an entsprechenden murinen DNA-Motiven für YY-Proteine, welche ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit identifiziert worden sind, zeigen. Außerdem soll der Einfluss von Mutationen der Promotor-assoziierten YY1 DNA-Bindungsstellen des murinen IFN- β Gens im genomischen Kontext (Promotor inklusive *upstream* Kontrollbereich) verifiziert werden.

4. Material & Methoden

4.1 Geräte

Cleanbenches	Heraeus, HLB 2448
	Heraeus, HSP 18
Elektrotransformator	BioRad Gene Pulser II
ELISA-Reader	Wallace Victor Multiple counter plate reader
Expositionskammer	Molecular Dynamics 35 cm x 43 cm
Filmmaterial	Hyperfilm ECL, Amersham Bioscience
Fluorometer	Hoefer DyNA Quant 200
Gel-/Bildanalyse Software	Molecular Dynamics Image Quant
Gelelektrophoresekammer	BRL Horizon 1114
	Gibco BRL Horizon 58
	Gibco BRL Horizon 2025
	Gibco BRL Vertical V16
	Mini Protean 3 Cell (Biorad)
Geltrockner	PH-T60, Biotec-Fischer
Kühlzentrifugen	RC5C, Sorvall Instruments
	CR412, Juoan
Luminometer	Lumat 9501 bzw. 9507, Berthold Technologies
Membran-Vakuumpumpe	MZ 2C, Vacubrand
Mischgerät	Inverter REAX 2, Heidolph
Netzgeräte	POWER-PAC 300 (BioRad)
ThermoCycler	Biometra T3 Thermocycler
pH-Meter	Φ 340, Beckmann
Phosphoimager	STORM 680, Molecular Dynamics
Photometer	Eppendorf BioPhotometer
Scintillationszähler	Beckmann LS 6500
Taumelschüttler	REAX 3, Heidolph
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Tischzentrifugen	Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco
	Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico
Ultraschallhomogenisator	Sonopuls HD 2200, Bandelin
UV-Kammer	Hanau
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Milli-Q Water Purification System
Zellkultur-Inkubator	Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336
Zellzähler	Schärfe System Casy 1

4.2 Materialien

4.2.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Amersham, Bayer, Biolabs, BioRad, Boehringer, BRL, Difco, Fluka, Gibco, Hoechst, MBI Fermentas, Merck, Pharmacia, Promega, Qiagen, Roche Pharma, Roth, Serva, Sigma und Stratagene verwendet.

Radioaktive Chemikalien wurden von der Firma Amersham bezogen.

4.2.2 Enzyme

Die Enzyme wurden von den Firmen Biolabs, Boehringer, BRL, Invitrogen, Merck, Promega und Roche Pharma bezogen.

4.2.3 Translationssysteme

Es wurde das „*rabbit reticulocyte lysate*“ von Promega verwendet.

4.2.4 Zellkulturmaterialien

Das Kunststoff-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

4.2.5 Filterpapiere und Transferfolien

DEAE-Papier	Whatman 3MM
Nitrocellulose-Membran	Hybond ECL, NC (Amersham)
Nylonmembran	Hybond-XL (Amersham)
Rundfilter	NitroPure, NCL (Macherey-Nagel)
Sterilfiltration	Sartorius Membranfilter, Porengröße 0.45 µm und 0.22 µm, d = 47 mm

4.2.6 Computerprogramme

Die Auswertung von Autoradiographien wurde mittels *Image Quant Version 5.0* von Molecular Dynamics durchgeführt. Die Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen, das heißt Sequenzanalysen und Restriktionskartierungen sowie Verwaltung von Oligonukleotiden, erfolgte mittels *Vector NTI 5.0* und *7.0*. Verifizierungen von DNA-Sequenzierungsschrogrammen wurden mittels *Chromas 1.45* bzw. *2.21* vorgenommen.

4.2.7 Plasmide

Erhaltene Plasmide:

pcDNA3FLAGYY2	Eukaryontisches Expressionsplasmid (pcDNA3, Invitrogen) für N-terminal FLAG-tag fusioniertes YY2 (Ed Seto; Tempa, Florida).
pCEP4FLAGYY1	Eukaryontisches Expressionsplasmid (pCEP4, Invitrogen) für N-terminal FLAG-tag fusioniertes YY1. Trägt außerdem das

	EBNA-1 Gen zur episomale Replikation (Ed Seto; Tempa, Florida).
pILGTkneo	Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus Luciferase und EGFP unter Kontrolle eines 281 bp umfassenden Fragments des induzierbaren humanen IFN- β Promotors. Als Selektionsmarker dienen die Gene für Neomycin-phosphotransferase und Thymidinkinase (A. Knopp; GBF, Braunschweig).
pILGTkneoEcoC	Wie pILGTkneo (s.o.); enthält zudem ein etwa 4.5 kb großes genomisches Fragment aus der humanen IFNB1-Domäne (EcoC-Fragment; Mielke <i>et al.</i> , 1990) <i>upstream</i> des humanen IFN- β Promotors (A. Knopp; GBF, Braunschweig).
pGAD424	Hefe-Expressionsplasmid, das für die Aktivierungsdomäne (AD) des transkriptionellen Aktivators GAL4 aus Hefe kodiert. Ferner besitzt das Plasmid einen LEU2 Selektionsmarker und einen eukaryontischen Ori (Bartel <i>et al.</i> , 1993; MATCHMAKER <i>Yeast One-Hybrid System</i> , Clontech).
Hergestellte Plasmide:	
pGAD424YY1	Hefe-Expressionsplasmid, das für Fusionsprotein aus GAL4-AD und YY1 kodiert. Die YY1-cDNA wurde mit dem Primerpaar P1984/P1985 PCR-amplifiziert und über Sall/BglII in pGAD424 eingebracht. Weitere Merkmale wie bei pGAD424.
pGAD424YY2	Hefe-Expressionsplasmid, das für Fusionsprotein aus GAL4-AD und YY2 kodiert. Die YY2-cDNA wurde über EcoRI/Sall in pGAD424 eingebracht. Weitere Merkmale wie bei pGAD424.
pHISi-1sE7/H6	Hefe-Targetplasmid (pHISi-1 ist ein Integrations- und Reporterplasmid für das MATCHMAKER <i>Yeast One-Hybrid System</i> , Clontech) mit einer Kopie der sE7 DNA-Sequenz (Primerpaar P1470/P1471) in 5'-3' Richtung, entsprechend der Originalsequenz des EcoC Fragments. Die Insertion erfolgte 5' eines Minimalpromotors des HIS3locus ($P_{\min HIS}$) aus Hefe. Das HIS3 Gen diente hierbei als Integrationsmarker.
pLacZisE7/18	Hefe-Targetplasmid (pLacZi ist ein Integrations- und Reporterplasmid für das MATCHMAKER <i>Yeast One-Hybrid System</i> , Clontech) mit einer Kopie der sE7 DNA-Sequenz

	(Primerpaar P1470/P1471) in 5'-3' Richtung, entsprechend der Originalsequenz des EcoC Fragment, Die Insertion erfolgte 5' eines Minimalpromotors des Iso-1-cytochrom C Gens (P _{CYC1}) aus Hefe. Ein zusätzliches URA3 Gen diente hierbei als Integrationsmarker.
pILGTkneoEcoCMutHS1	Wie pILGTkneoEcoC (s.o.); dieses Konstrukt enthält jedoch eine mittels <i>QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit</i> (Stratagene) eingefügte Mutation in der YY1/YY2 DNA-Bindungsstelle innerhalb der HS1-Region des EcoC-Fragments (Primerpaar P1740/P1741).
pILGTkneoEcoCMutHS2	Wie pILGTkneoEcoC (s.o.); dieses Konstrukt enthält jedoch eine mittels <i>QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit</i> (Stratagene) eingefügte Mutation in der YY1/YY2 DNA-Bindungsstelle innerhalb der HS2-Region des EcoC-Fragments (Primerpaar P1672/P1673).
pILGTkneoEcoCMutHS1/HS2	Wie pILGTkneoEcoCMutHS1 (s.o.); dieses Konstrukt enthält jedoch eine zweite mittels <i>QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit</i> (Stratagene) eingefügte Mutationen in der YY1/YY2 DNA-Bindungsstelle der destabilisierten Regionen HS2 des EcoC-Fragments (Primerpaar P1672/P1673).
pILGTkneoEcoCMutHS3	Wie pILGTkneoEcoC (s.o.); dieses Konstrukt enthält jedoch eine mittels <i>QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit</i> (Stratagene) eingefügte Mutation in der Faktor B DNA-Bindungsstelle innerhalb der HS3-Region des EcoC-Fragments (Primerpaar P1736/P1737).
pcDNA3.1(-)FLAGYY1	Eukaryontisches Expressionsplasmid (pcDNA3.1(-), Firma Invitrogen) für N-terminal FLAG-tag fusioniertes YY1. Die YY1 cDNA wurde über XbaI/EcoRI in pcDNA3.1(-) eingebracht.
pcDNA3.1(-)FLAGYY2	Eukaryontisches Expressionsplasmid für N-terminal FLAG-tag fusioniertes YY2. Die YY2 cDNA wurde mit dem Primerpaar P2081/P2083 PCR-amplifiziert und über XbaI/EcoRI in pcDNA3.1(-) eingebracht.

4.2.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind stets unter ihrem ursprünglichen Synthesenamen in 5'-3' Orientierung aufgelistet. Neben der Nukleotidsequenz sind in Klammern eventuell in dieser Arbeit verwendete Synonyma und die Synthesenummern der einzelnen Oligonukleotide angegeben.

EMSA-Oligonukleotide:

EMSA0afw	TGAACCACATGTGGCTGGTGAGCATTTTATATGGTACTAGTCTAAATTGA (P1579)
EMSA0are	TCAATTTAGACTAGTACCATATAAAATGCTCACCAGCCACATGTGGTTCA (P1580)
EMSA0bfw	TTTATATGGTACTAGTCTAAATTGACATCTACTGTGAGTGTA AAAATGTG (P1581)
EMSA0bre	CACATTTTACACTCACAGTAGATGTCAATTTAGACTAGTACCATATAAA (P1582)
EMSA0cfw	TCACCTGTTTCTTTTCCTCTTTCAATATGGCTACTAGAGCTTTTAAATT (P1583)
EMSA0cre	AATTTAAAAAGCTCTAGTAGCCATATTGAAAGAGGAAAAAGAAACAGGTGA (P1584)
EMSA0dfw	TATGGCTACTAGAGCTTTTTAAATTGCATTATGTGACTTTATTGGACAGT (P1585)
EMSA0dre	ACTGTCCAATAAAGTCACATAATGCAATTTAAAAAGCTCTAGTAGCCATA (P1586)
EMSA1fw	CATCTACTGTGAGTGTA AAAATGTGCATTATGTTTTGAAGACTGTACACA (P945)
EMSA1re	TGTGTACAGTCTTCAAAACATAATGCACATTTTACACTCACAGTAGATG (P946)
EMSA2fw	AAATTTAATTATCTCATGAATAATTTTAGATTGGTTATATGTTGAAATTA (P947)
EMSA2re	TAATTTCAACATATAACCAATCTAAAATTATTCATGAGATAATTAAATTT (P948)
EMSA3fw	TAATATTTTGGATATACTATGCTAAATAAAACATATTATTTAAATTA ACT (P949)
EMSA3re	AGTTAATTTTAATAATATGTTTTATTTAGCATAGTATATCCAAAATATTA (P950)
EMSA4fw	CATTATGTTTTGAAGACTGTACACAAAATTTAATTATCTCATGAATAATT (P951)
EMSA4re	AATTATTCATGAGATAATTAAATTTTGTGTACAGTCTTCAAAACATAATG (P952)
EMSA5fw	TTAGATTGGTTATATGTTGAAATTATAATTTTGGATATACTATGCTAA (P953)
EMSA5re	TTAGCATAGTATATCCAAAATATTATAATTTCAACATATAACCAATCTAA (P954)
EMSA6fw	ATAAAACATATTATTTAAATTA ACTTTCACCTGTTTCTTTTCCTCTTTCAA (P956)
EMSA6re	TTGAAAGAGGAAAAAGAAACAGGTGAAGTTAATTTTAATAATATGTTTTAT (P957)
EMSA7fw	CAAGCCACTATTTAAATGGTGGTTTACTTCCTTTTATTAATTTTCTCTAC (P995)
EMSA7re	GTAGAGAAAATTAATAAAAGGAAGTAAACCACCATTTTAATAGTGGCTTG (P996)
EMSA8fw	ACTTCCTTTTATTAATTTTCTCTACATATTTTTCATAATCATGTTGTAT (P997)
EMSA8re	ATACAACATGATTATGCAAAAATATGTAGAGAAAATTAATAAAAGGAAGT (P998)
EMSA9fw	ATATTTTTCATAATCATGTTGTATGTACAATTTTATGTTCTATTTTTCA (P999)
EMSA9re	TGAAAAATAGAACATAAAAATTGTACATACAACATGATTATGCAAAAATAT (P1000)
EMSA10fw	GTACAATTTTATGTTCTATTTTTCAATATTA ACTGGTGTCTTTCAAATTT (P1001)
EMSA10re	AAATTTGAAAGACACCAGTTAATATTGAAAAATAGAACATAAAAATTGTAC (P1002)
EMSA11fw	ATATTA ACTGGTGTCTTTCAAATTTCTTAATGACAAAAATAATATATGCT (P1003)
EMSA11re	AGCATATATTATTTTTGTCTATTAGGAAATTTGAAAGACACCAGTTAATAT (P1004)
EMSA12fw	CCTAATGACAAAAATAATATATGCTCATAATAGAACATTTTAAATGCAAA (P1005)
EMSA12re	TTTGCATTTAAATGTTCTATTATGAGCATATATTATTTTTGTCTATTAGG (P986)
EMSA13fw	CATAATAGAACATTTTAAATGCAAATAAAACAAAATAAATGTTAAATTTT (P987)
EMSA13re	AAATTTTAACATTTATTTTGTTTTATTTGCATTTAAATGTTCTATTATG (P988)
EMSA14fw	TAAAACAAAATAAATGTTAAATTTAGTAATATTATTAATTTTCTCCA (P989)
EMSA14re	TGGAGAAAATTTAATAAATATTACTAAATTTTAACATTTATTTTGTTTTA (P990)
EMSA15fw	AGTAATATTTATTAATTTTCTCCAAGTGCACGAAATTACAAATGTAACA (P991)
EMSA15re	TGTTACATTTGTAATTTTCGTGCACCTGGAGAAAATTTAATAAATATTACT (P992)
EMSA16fw	AGTGCACGAAATTACAAATGTAACAACCTAATCCCTAGTGGCCTAATAA (P993)
EMSA16re	TTATTAGGCCACTAGGGAATTAGGTTGTTACATTTGTAATTTTCGTGCACT (P994)
EMSA17fw	CCGTGGATTCTACTGACTGTAGATGGAAAAATTTTTTAAAAATACAATA (P1638)
EMSA17re	TATTGTATTTTTAAAAAATTTTTCCATCTACAGTCAGTAGAATCCACGG (P1639)
EMSA17afw	CATCTACAGTCAGTAGAATCCACGGATACAGAACCTATGGATAGGAAGGA (P1640)
EMSA17are	TCCTTCCTATCCATAGGTTCTGTATCCGTGGATTCTACTGACTGTAGATG (P1641)
EMSA17bfw	ATACAGAACCTATGGATAGGAAGGACCAACTGTATCTTTAGTGTTTTGA (P1642)
EMSA17bre	TCAAAACACTAAAAGATACAGTTGGCTTCCTATCCATAGGTTCTGTAT (P1643)
EMSA18fw	GAAAAATTTTTTTAAAAATACAATAAAAAATAATAATACAACAACAAAAAA (P1644)
EMSA18re	TTTTTGTGTGTGATTATTATTTTTATTGTATTTTTAAAAAATATTTTC (P1645)
EMSA19fw	AAAATAATAATACAACAACAAAAAATAATGTAAATTTTAAAGATACAGTG (P1646)
EMSA19re	CACTGTATCTTTAAATTTACATTATTTTTTGTGTGTGATTATTATTTT (P1647)
EMSA20fw	TAATGTAAATTTTAAAGATACAGTGTTACAGCTATTTAGCATTTATATTG (P1648)
EMSA20re	CAATATAAATGCTAAATAGCTGTAACACTGTATCTTTAAATTTACATTA (P1649)
EMSA21fw	TTACAGCTATTTAGCATTTATATTGTATCAGGTATTATAAGTAATCTAGG (P1650)
EMSA21re	CCTAGATTACTTATAATACCTGATACAATATAAATGCTAAATAGCTGTAA (P1651)
EMSA22fw	TATCAGGTATTATAAGTAATCTAGGGATGATTTAAATATACAGAAATAC (P1652)
EMSA22re	GTATTTCTGTATATTTTAAATCATCCCTAGATTACTTATAATACCTGATA (P1653)
EMSA23fw	GATGATTTAAATATACAGAAATACATGTGCAGATTATATGCAAACTACTG (P1654)
EMSA23re	CAGTATTTGCATATAATCTGCACATGTATTTCTGTATATTTTAAATCATC (P1655)
EMSA24fw	CTCAATTCCTCTTATAAAACGTTGCAGTATTTGCATATAATCTGCACAT (P1656)
EMSA24re	ATGTGCAGATTATATGCAAACTACTGCAACGTTTTATAAGAGGGAATTGAG (P1657)

EMSA25fw	CCACAGATACCAAAATCAGAGGATGCTCAATTCCCTCTTATAAAACGTTG (P1658)
EMSA25re	CAACGTTTTATAAGAGGGAATTGAGCATCCTCTGATTTTGGTATCTGTGG (P1659)
EMSA26fw	TTCTAGGACCACCATCCCGCTGCCTCCACAGATACCAAAATCAGAGGATG (P1660)
EMSA26re	CATCCTCTGATTTTGGTATCTGTGGAGGCAGCGGGATGGTGGTCCTAGAA (P1661)
sE7fw	CAAGCCACTATTAATAATGGTGGTTTACTTC (P1470)
sE7rev	GAAGTAAACCACCATTTTAATAGTGGCTTG (P1471)
sE7mut1fw	CAAGGGCTAATTAATAATGGTGGTTTACTTC (M1fw; P1472)
sE7mut1re	GAAGTAAACCACCATTTTAATTAGCCCTTG (M1re; P1473)
sE7mut2fw	CAAGCCAACGCGTAAATGGTGGTTTACTTC (M2fw; P1480)
sE7mut2re	GAAGTAAACCACCATTACGCGTTGGCTTG (M2re; P1481)
sE7mut3fw	CAAGCCACTAACGCGTTGGTGGTTTACTTC (M3fw; P1474)
sE7mut3re	GAAGTAAACCACCAACGCGTTAGTGGCTTG (M3re; P1475)
sE7mut5fw	CAAGCCACTATTAATAATCTCGAGTTACTTC (M4fw; P1476)
sE7mut5re	GAAGTAACTCGAGATTTTAATAGTGGCTTG (M4re; P1477)
sE7mut6fw	CAAGCCACTATTAATAATGGTCTCGAGCTTC (M5fw; P1482)
sE7mut6re	GAAGCTCGAGACCATTTTAATAGTGGCTTG (M5re; P1483)
sE7mut7fw	CAAGCCACTATTACAATGGTGGTTTACTTC (M6fw; P1563)
sE7mut7re	GAAGTAAACCACCATTGTAATAGTGGCTTG (M6re; P1570)
sE7mut8fw	CAAGCCACTATTAACATGGTGGTTTACTTC (M7fw; P1564)
sE7mut8re	GAAGTAAACCACCATTGTAATAGTGGCTTG (M7re; P1571)
sE7mut9fw	CAAGCCACTATTAACACTGGTGGTTTACTTC (M8fw; P1565)
sE7mut9re	GAAGTAAACCACCAGTTTAATAGTGGCTTG (M8re; P1572)
sE7mut10fw	CAAGCCACTATTAATAACGGTGGTTTACTTC (M9fw; P1566)
sE7mut10re	GAAGTAAACCACCAGTTTAATAGTGGCTTG (M9re; P1573)
sE7mut11fw	CAAGCCACTATTAATAATAGTGGTTTACTTC (M10fw; P1567)
sE7mut11re	GAAGTAAACCACCATTTTAATAGTGGCTTG (M10re; P1574)
sE7mut12fw	CAAGCCACTATTAATAATGATGGTTTACTTC (M11fw; P1568)
sE7mut12re	GAAGTAAACCACCATTTTAATAGTGGCTTG (M11re; P1575)
sE7mut13fw	CAAGCCACTATTAATAATGGCGTTTACTTC (M12fw; P1569)
sE7mut13re	GAAGTAAACCGCCATTTTAATAGTGGCTTG (M12re; P1576)
sE26fw	TTCTAGGACCACCATCCCGCTGCCTCCACA (P1676)
sE26re	TGTGGAGGCAGCGGGATGGTGGTCCTAGAA (P1677)
sE26remut1	TGTGGAGAATTCGGGATGGTGGTCCTAGAA (mut1; P1728)
sE26remut2	TGTGGAGGCAGCGAATTCGTGGTCCTAGAA (mut2; P1729 und 1732)
sE26remut2a	TGTGGAGGCAGCCCTAGGGTGGTCCTAGAA (mut6; P1743)
sE26remut2b	TGTGGAGGCAGCAGATCTGTGGTCCTAGAA (mut7; P1744)
sE26remut2c	TGTGGAGGCAGCATCGATGTGGTCCTAGAA (mut8; P1745)
sE26remut3	TGTGGAGGCAGCGGGATGGAATTCCTAGAA (mut3; P1730)
sE26remut4	TGTGAATTCAGCGGGATGGTGGTCCTAGAA (mut4; P1734)
sE26remut5	TGTGGAGGCAGCGGGATGGTGAATTCGAA (mut5; P1735)
sE26remut6	TGTGGAGGCAGAATTCATGGTGGTCCTAGAA (mut9; P1746)
sE26remut7	TGTGGAGGCAGCGGGGAATTCGTCTCTAGAA (mut10; P1747)
sE26remut8	CTATGCTAAATAGGGATGGTGGTCCTAGAA (mut11; P1771)
sE26remut9	TGTCTATGCTAAATAATGGTGGTCCTAGAA (mut12; P1772)
sE26remut10	TGTGGACTATGCTAAATAGTGGTCCTAGAA (mut13; P1773)
sE26remut11	TGTGGAGGCCTATGCTAAATAGTCCTAGAA (mut14; P1774)
sE26remut12	TGTGGAGGCAGCCTATGCTAAATACTAGAA (mut15; P1775)
sE26remut13	TGTGGAGGCAGCGGGCTATGCTAAATAGAA (mut16; P1776)
sE26remut14	TGTGGAGGCAGCGGGATGCTATGCTAAATA (mut17; P177)
msE74fw	TATATTACAAACAAAATGGAATAGTGACAC (msE7 1fw; P1587)
msE74re	GTGTCACTATTCCATTTTGTGTGTAATATA (msE7 1re; P1588)
msE75fw	GATTCAATGTCCAAAATGGAGTAGCTATAT (msE7 2fw; P1589)
msE75re	ATATAGCTACTCCATTTTGGACATTGAATC (msE7 2re; P1590)
msE76fw	GTCCCTTTACCATGTGCATACCATGGCTGTC (msE7 3fw; P1591)
msE76re	GACAGCCATGGTATGACATGGTAAAGGGAC (msE7 3re; P1592)
hIFNpYYfw	GAAACTACTAAAATGTAAATGACATAGGAA (P ^{hu} fw; P1970)
hIFNpYYre	TTCTATGTCAATTACATTTTAGTAGTTTC (P ^{hu} re; P1971)
mulIFNp90fw	GGCCTTTTCCTCTGTCAATTTCTCTTGATC (P ^{mu} fw; P2010)
mulIFNp90re	GATCAAGAGAAAATGACAGAGGAAAAGGCC (P ^{mu} re; P2011)
PUR 2	GGAGGTGGTGGAGGGAGAGAAAAGGTCGAC (P1983)
PUR F	GATGGAGGTGGTGGAGGGAGAGAAAAGGAT (P2077)

Kompetitor-Oligonukleotide:

EMSAkt1fw ACAGGAGCTTCTGACACTGAAAATTGCTGCTTCTTTGTAGGAATCCAAGC (P1257)
 sE3fw ATACTATGCTAAATAAAACATATT (P1500)
 NF1fw TTTGGCACGGAGCCAAC (P1243)
 NF1rev GTTGGCTCCGTGCCAAA (P1244)

PCR-Amplifikationsprimer:

SalFLAGYY1 GCGGTCGACATGGCCTCGGGCGACACCCTCTACATCG (P1985)
 BglIIYY1re GCGAGATCTTGGTCGAGAAGGGTCTTCTCTCTCTTTTC (P1984)
 YY2FlagXba CCGCTCTAGAATGGACTACAAGGACGACGA (P2083)
 YY2EcoRIre CGCCGAATTCTCACGGGTTGTTTTTGGTCTTCAC (P2081)

Mutagenese-Primer:

MUTAsE7fw GCCAAATCAAGCCACTATTAATAATCTCGAGTTACTTCCTTTTATTAATTTTCTC (P1672)
 MUTAsE7re GAGAAAATTAATAAAAAGGAAGTAAGTCTCGAGATTTTAATAGTGGCTTGATTGGC (P1673)
 MUTHS1fw CTTCACCTGTTTCTTTTCCTCTTTCAATACTCGAGCTAGAGCTTTTTTAAATTGC (P1740)
 MUTHS1re GCAATTTAAAAAGCTCTAGCTCGAGTATTGAAAGAGGAAAAGAAACAGGTGAAG (P1741)
 MUTAHS3fw CAAAGAAGATTGGTTCTAGGACCACGAATTCGCTGCCTCCACAGATACCAAAATC (P1736)
 MUTAHS3re GATTTTGGTATCTGTGGAGGCAGCGAATTCGTGGTCCTAGAACCAATCTTCTTTG (P1737)

ChIP-Oligonukleotide:

HS2Chip2fw TGAGATGGCCAAGGTCTTGC (P1946)
 EMSA12re (s.o.; EMSA-Oligonukleotide)

4.2.9 Antikörper**Primäre Antikörper:**

Kaninchen anti-PUR β (302-324; murin); Robert Kelm, USA, VT
 Kaninchen anti-PUR α (291-313; murin); Robert Kelm, USA, VT
 Maus anti-FLAG (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C); M2, Sigma (No. F3165)
 Kaninchen anti-YY1 (humanes, C-terminales Peptid; C-20); SantaCruz (sc-281x)
 Kaninchen anti-YY1 (humanes YY1 (1-414); H-414); SantaCruz (sc-1703)
 Maus anti-Oct1 (*Xenopus laevis*, C-terminales Peptid (462-760)); SantaCruz (sc-8024x)
 Ziege anti-Vimentin (humanes C-terminales Peptid; C-20); SantaCruz (sc-7557)

4.3 Allgemeine Grundtechniken

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

4.3.1 Sterilisation

Glasgeräte werden mindestens 4 h vor Gebrauch bei 180 °C im Trockenschrank hitze-sterilisiert. Alle Lösungen werden entweder sterilfiltriert (0.22 μ m Filter) oder 20 min, bei 121 °C und einem Druck von 1 bar autoklaviert.

4.3.2 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung versetzt man 1 Volumen wässriger DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 4 M LiCl und 2.5 Volumen Ethanol und zentrifugiert diesen Ansatz für mindestens 30 min, bei 13000 UpM und 4 °C. Das Pellet wird anschließend zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, 10 min getrocknet und in MQ-Wasser bzw. TE resuspendiert.

4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.3.3.1 ... durch Fluorometrie

Hoechstfarbstoff H33258	(für doppelsträngige DNA)
Kalbthymus-DNA Standard	100 µg/ml
10 x TNE-Puffer	100 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 1 M NaCl (pH 7.4)
Färbelösung	0.1 µg/ml Hoechstfarbstoff in 1 x TNE-Puffer

Die Nukleinsäure-Konzentration wird mit Hilfe eines Fluorometers ermittelt. Dazu werden 2 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung in 2 ml Färbelösung (vorgelegt in die Küvette) bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ gemessen. Die Kalibrierung des Geräts erfolgt zuvor durch 2 µl des DNA-Standards in 2 ml der Färbelösung.

4.3.3.2 ... durch Photometrie

Die Extinktion der Nukleinsäure wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht annähernd 50 µg DNA bzw. 35 µg RNA in 1 ml Volumen. Die optische Dichte ist hierbei abhängig vom GC-Gehalt der DNA-Lösung. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA mit einem 72 %igem GC-Anteil beträgt die OD 1.04, während bei einem 30 %igem GC-Anteil die OD 0.94 beträgt.

Das Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktion sollte für eine sorgfältig präparierte und proteinfreie Nukleinsäure bei 1.8 (DNA) und 2.0 (RNA) liegen.

4.3.3.3 ... durch Elektrophorese

Geringe Nukleinsäuremengen lassen sich auch durch Elektrophorese eines Aliquots abschätzen. Die Fluoreszenzintensität der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ist ihrer Menge direkt proportional. Daher kann durch visuellen Vergleich der unbekannten Probe mit einer DNA bekannter Konzentration die unbekannte Menge abgeschätzt werden.

4.4 Arbeiten mit *Escherichia coli*

4.4.1 Verwendete *E. coli* - Stämme

DH10B:	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL endA1 nupG
XL1-blue:	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ⁻ proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (tet ^r)] (Bullock. 1987)
TOP10 F ['] :	F ⁻ {lacI ^q Tn10 (Tet ^r)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG (Fa. Invitrogen)
XL1-Blue (<i>supercompetent cells</i>):	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ⁻ proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 tet ^r)]

4.4.2 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; autoklavieren.
SOC-Medium	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 0.5 g/l NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ (SOB-Medium); autoklavieren; das autoklavierte SOB-Medium wird nach dem Abkühlen mit 20 mM Glucose (e.c.) versetzt.
Agarplatten	Pro Liter LB-Medium werden 15 g Agar zugegeben. Zur Herstellung Ampicillin-haltiger Agarplatten wird 1/1000 Ampicillin einer steril-filtrierte Stammlösung (50 mg/ml in Ethanol) beigemischt (v/v). Kanamycinplatten erhalten 50 µg/ml Kanamycin anstelle von Ampicillin.

E. coli Zellen werden in Flüssigmedium (LB ± Antibiotikum) bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Dazu werden 5 ml Kulturmedium mit einer *E. coli* Kolonie (Einzelklon von einer Agarplatte) angeimpft. Nach 6-8 h kann mit dieser Vorkultur die Hauptkultur (V = 50-1000 ml) angeimpft werden.

4.4.3 Herstellung kompetenter Bakterien

1 Liter LB-Medium wird mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Die Kultivierung der Zellen erfolgt bei 37 °C unter starkem Schütteln (180 UpM) bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5-1. Die Zellen werden anschließend für 10 min bei 4 °C und 3000 UpM pelletiert (GS3-Rotor). Das Zellpellet wird in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 4 °C, 3000 UpM). Nach diesem Schritt wird das Pellet in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen und wiederum zentrifugiert (10 min, 4 °C, 3000 UpM). Nun wird das Pellet in 20 ml kaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert, ein letztes Mal zentrifugiert (10 min, 4 °C, 3000 UpM) und schließlich in einem Endvolumen von 2-3 ml 10 %igem Glycerin aufgenommen. Die Zellen werden zügig in flüssigem Stickstoff á 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

4.4.4 Transformation von *E. coli*

4.4.4.1 Elektrotransformation

Bei der Elektrotransformation wird ein Gemisch aus DNA und kompetenten Zellen einem exponentiell abfallenden elektrischen Feld mit einer sehr hohen Ausgangsamplitude ausgesetzt. Die Transformationseffizienz liegt je nach Qualität der elektrokompenten Bakterien bei 10^9 - 10^{10} Transformanten/ μg DNA.

Ein 50 μl Aliquot der kompetenten Zellen wird bei RT aufgetaut und auf Eis gelagert. 1 μl Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes wird hinzugegeben, gut gemischt, und der Ansatz wird in eine sterile, vorgekühlte 0.2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend wird die Küvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt (2.5 kV, 25 μF und 200 Ω). Die Zeitkonstante, die am Gerät überprüft werden kann, sollte zwischen 4-5 ms betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann 112.5 kV/cm. Anschließend werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenbergröhrchen oder 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 37 °C 30-60 min geschüttelt. Final werden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert. Die Kultivierung erfolgt über Nacht bei 37 °C. Erhaltene Klone können schließlich durch eine „Mini“- Plasmidpräparation charakterisiert werden (s. 4.5.1).

4.4.4.2 Chemische Transformation

2-10 μl Ligationsansatz (ca. 25-100 ng DNA) werden zu 50 μl kompetenten Zellen (TOP10F') gegeben und der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 sec Hitzeschock-behandlung bei 42 °C werden die Bakterien 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 0.25 ml SOC-Medium wird der Transformationsansatz für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen werden in 10-100 μl Portionen auf entsprechenden Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten mittels eines Drigalski-Spatels ausplattiert.

4.4.5 Anlage von Glycerinkulturen

Ein kurzfristiges Aufbewahren (bis 6 Wochen) von auf Agarplatten ausgestrichenen Bakterienkolonien erfolgt im Kühlraum bei 4 °C. Eine langfristige Lagerung ist als Stammkultur möglich. Hierzu wird 87 %iges Glycerin im Verhältnis 1:1 mit einer Übernachtskultur gemischt und bei -70 °C gelagert.

4.5 Isolierung von Nukleinsäuren

4.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab: *Boiling Prep*

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle *E. coli* Laborstämme (vgl. 4.4.1). Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (etwa 30 min) und in der hohen Qualität der DNA (sequenziertauglich; basiert auf der *Boiling Prep* nach Holmes und Quigley (1981)).

STET-Puffer:	(für 500 ml)
8 % Sucrose	40 g
0.5 % Triton X-100	12,5 ml Triton 20 %
50 mM EDTA	50 ml 0.5 M EDTA
10 mM Tris (pH 8.0)	5 ml 1 M Tris/HCl (pH 8.0)
LTE:	10 mg Lysozym/1 ml TE
7.5 M NH ₄ Ac	
TER:	10 µg RNase A/1 ml TE

Eine 2 ml LB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wird für 6-18 h bei 37 °C geschüttelt. Nach dem Umfüllen in 2 ml Eppendorfgefäße werden die Proben für 2 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Die Pellets werden in 500 µl STET-Puffer aufgenommen, gevortext, mit 50 µl LTE versetzt und gemischt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT, werden die Proben für 90 sec in einem Eppendorf-Thermomixer bei 95 °C erhitzt. Hiernach wird 5 min bei 15000 UpM zentrifugiert und das zähflüssige Pellet anschließend mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt wird. Zum Überstand werden 50 µl 8 M NH₄OAc und 500 µl Isopropanol gegeben, gevortext und für 5 min bei 15000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30-50 µl TER aufgenommen.

4.5.2 Präparative Plasmidisolierung mittels QIAGEN Maxi Kits

Puffer P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris/HCl (pH 8.0)
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH
	1 % SDS
Puffer P3 (Neutralisierungspuffer):	3.0 M KOAc (pH 5.5)
Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer):	750 mM NaCl
	50 mM MOPS (pH 7.0)
	15 % Isopropanol
	0.15 % Triton X-100
Puffer QC (Waschpuffer):	1.0 M NaCl
	50 mM MOPS (pH 7.0)
	15 % Isopropanol
Puffer QF (Elutionspuffer) :	1.25 M NaCl
	50 mM Tris/HCl (pH 8.5)
	15 % Isopropanol

Es werden 100-500 ml LB-Medium mit 2 ml einer Bakterienvorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren im GS3-Rotor (10 min, 7000 UpM (6000 x g), 4 °C) wird das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 5 min bei RT inkubiert. Es folgt die Zugabe von 10 ml gekühltem Puffer P3 und eine Inkubation für 20 min auf Eis. Nach der Zentrifugation (30 min, 13000 UpM ($\geq 20000 \times g$), 4 °C) im GSA-Rotor wird der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, über einen vor-gefeuchteten Filter in eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN-Tip-Säule 500 gegeben. Diese Säule bindet die DNA über ein Anionenaustauscherharz unter entsprechend geringen Salz- und pH-Konditionen. Nach dem zweimaligem Waschen der Säule mit je 30 ml Puffer QC, bei der RNA, Proteine und niedermolekulare Verbindungen entfernt werden, wird die Plasmid-DNA mit 15 ml des Hochsalz-Puffers QF eluiert. Anschließend werden 10.5 ml Isopropanol zugegeben und 30 min bei 4 °C und 13000 UpM ($\geq 15000 \times g$) zentrifugiert. Das Pellet wird mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und 10 min zentrifugiert (4 °C, 13000 UpM ($\geq 15000 \times g$)). Die Plasmid-DNA wird in 500-1000 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

4.5.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen via „QIAquick“ Gel Extraction Kit

Das „QIAquick“ Gel Extraction Kit ist eine einfache und schnelle Methode, um aus Agarosegelen DNA-Fragmente mit einer Größe von 0.1-10 kb zu isolieren. Das Prinzip der Gel Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Die zu isolierende DNA wird aus einem Agarosegel ausgeschnitten und nach Herstellerangaben über eine Säule gereinigt.

4.5.4 Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen: Quick-HMW-DNA

(nach Ramirez-Solis *et al.*, 1993)

„Modified Bradleys“	10 mM Tris/HCl (pH 7.5); 2 mM EDTA; 10 mM NaCl; 0,5 % SDS; 1 mg/ml Proteinase K
---------------------	---

Konfluent gewachsene Zellen einer 6-well Platte werden mit PBS gewaschen, gegebenenfalls mit einem entsprechenden Agens modifiziert und mit 0.5 ml der Proteinase K-Lösung versetzt. Nach Überführen der Lösung in 1.5 ml Reaktionsgefäße folgt eine Inkubation über Nacht bei 55 °C. Anschließend wird die DNA durch die Zugabe von 100 % Ethanol mit 75 mM NaAc ohne Schütteln 2-3 h bei RT präzipitiert. Durch vorsichtiges Schwenken und einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1800 UpM wird die DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 1 ml 70 % Ethanol für 30 min gewaschen, zentrifugiert (s.o.) und nach Trocknung (10 min, RT) in 20-30 µl TE aufgenommen. Zum vollständigen Resuspendieren der DNA wird das Gemisch für etwa 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die erhaltene HMW-DNA kann direkt für

einen Restriktionsansatz und anschließende Southern Blot-Analyse eingesetzt werden. Hierfür empfiehlt sich der Einsatz von etwa 8 µl DNA.

4.5.5 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Chromatin Immunpräzipitation ist eine sehr wirkungsvolle Methode zur Untersuchung von Protein-DNA Interaktionen. Hierbei werden intakte Zellen unter Zuhilfenahme von Formaldehyd fixiert, wodurch Protein-Protein und Protein-DNA Komplexe chemisch kovalent miteinander verbunden werden (*crosslinking*). Anschließend wird die genomische DNA mittels Ultraschallbehandlung gespalten und spezifische Protein-DNA Komplexe durch Zugabe eines geeigneten Antikörpers gegen das zu untersuchende Protein immunpräzipitiert. Nach der Reversion des *crosslinking* und Entfernung aller Proteine durch eine Proteinase K Behandlung werden die DNA-Fragmente gereinigt. Final wird die DNA mittels PCR-Technik näher analysiert. Da die Protein-DNA Interaktion in einem endogenen, chromosomalen Kontext fixiert wird, reflektieren ChIP Ergebnisse den Einfluss chromosomaler Topologie und Effekte von regulatorischen Proteinen *in vivo*.

Für ein Standard-ChIP-Experiment werden die Zellen einer etwa zu 90 % konfluenten, mittleren TC-Platte mit 10 ml 1 % Formaldehyd/DME-Medium (ohne FCS) für 10 min auf einem Schwenktisch bei RT fixiert. Es folgen 3 Waschrunde mit 10 ml eiskaltem PBS bei 4 °C für 15 min. Die Zellen werden anschließend mittels *cell-scraper* von der Platte geerntet und in vorgekühlte 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Zelllyse erfolgt in 900 µl kaltem Puffer L1 (50 mM Tris, pH 8.0; 2 mM EDTA, pH 8.0; 0.1 % NP40; 10 % Glycerol; inkl. 1 x konzentriertem Proteaseinhibitormix) für 5 min auf Eis. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 3000 UpM werden die Rohnuclei von den cytoplasmatischen Proteinen getrennt. Die Zellkerne werden daraufhin in 600 µl kaltem Puffer L2 (50 mM Tris, pH 8.0; 5 mM EDTA, pH 8.0; 1 % SDS; inkl. 1 x konzentriertem Proteaseinhibitormix) resuspendiert und anschließend einer Ultraschallbehandlung (4 x für 12 sec bei einer Intensität von 50 %) unterzogen, wobei die genomische DNA in kleine einheitliche DNA-Fragmente zwischen 500-2000 bp zerstückelt wird. Zum Entfernen von Zelltrümmern aus der Kernfraktion folgt eine Zentrifugation bei 4 °C für 10 min und 13000 UpM. Für die folgende Immunpräzipitation werden pro Ansatz je 150 µl Kernfraktion mit 1350 µl Puffer DB (50 mM Tris, pH 8.0; 5 mM EDTA, pH 8.0; 200 mM NaCl; 0.5 % NP40; inkl. 1 x konzentriertem Proteaseinhibitormix) verdünnt bzw. bei -20 °C für spätere Versuche eingefroren. Vor der Immunpräzipitation wird der Mix aus Kernfraktion/DB für 2 h invertierend bei 4 °C mit 40 µl Heringssperma-DNA gesättigten Protein-G Agarose-beads vorgereinigt (ChIP IT Kit, Fa. Active Motif). Nach Abtrennen der Agarose-beads durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 3000 UpM wird der Überstand in ein frisches, gekühltes 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2-3 µg des entsprechenden Antikörpers versetzt. Es folgt eine Inkubation über Nacht invertierend bei 4 °C. Am nächsten Tag werden die Immunkomplexe durch Zugabe von 20 µl der oben beschriebenen Agarose-beads für 30 min bei 4 °C invertierend präzipitiert. Die Agarose-beads werden durch Zentrifugation (s.o.) zunächst vom Überstand getrennt. Aliquots des Überstandes dienen später als Positivkontrolle bei der PCR-Verifizierung. Die *beads* werden insgesamt siebenmal gewaschen:

einmal schnell in kaltem Waschpuffer WB (20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 1 % NP40; 0.1 % SDS); 3 x in 500 µl für 5 min auf Eis, kurz vortexen (Stufe 3) und 5 min, wie oben, zentrifugieren; 3 x wie zuvor in 500 µl kaltem 1 x TE. Bei allen Waschschritten ist darauf zu achten, dass der Überstand mit einer feinen Kanüle (27G x 7/8'', Rose GmbH; 1 ml Spritze, Omnifix®-F, Braun) abgezogen wird. Anschließend werden die Antigen-Antikörper Komplexe eluiert. Dazu werden die *beads* 3 x in 100 µl Puffer EB (1 x TE; 2 % SDS) mittels *finger-tipping* resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert; alle 2 min *finger-tipping* wiederholen. Zwischen den einzelnen Elutionen werden die *beads* bei RT für 2 min und 4000 UpM pelletiert. Die Überstände werden vereinigt und zur Reversion des *crosslinking* über Nacht bei 65 °C aufbewahrt. Nachdem die Probe nahezu RT erreicht hat werden 20 µg Proteinase K zum Entfernen der Proteine hinzu gegeben und 2 h bei 46 °C verdaut. Final werden die DNA-Fragmente über Säulen mit entsprechenden Puffern (ChIP IT Kit) gereinigt und in H₂O aufgenommen. Reversion des *crosslinkings*, Proteinase K Verdau und Säulenreinigung wird auch mit der PCR-Positivkontrolle (s.o.) parallel durchgeführt.

Die Verifizierung der immunpräzipitierten DNA-Fragmente erfolgt mit geeigneten Primern für den DNA-Bereich, der untersucht werden soll. Diese müssen zuvor empirisch auf HMW-DNA und ChIP-Kontrollen (positiv und negativ) ausgetestet werden und sollten PCR-Amplifikate zwischen 200-400 bp generieren. Die PCR-Bedingungen sind in 4.7.1 (HMW PCR-Protokoll) angegeben. Für die PCR werden, je nach Effizienz des Experiments, 1-10 µl ChIP-Eluat als *template* eingesetzt. Weitere Information bezüglich der PCR-Verifizierung sind dem ChIP IT *Instruction Manual* zu entnehmen.

4.6 Modifikation von Nukleinsäuren

4.6.1 Restriktionsanalyse von DNA

Ein mithilfe der analytischen oder präparativen Plasmidpräparation isoliertes Plasmid kann durch die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen charakterisiert oder verändert werden. Für die enzymatische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen werden die von den Herstellern der einzelnen Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen angewendet. Die DNA [1 µg/µl] wird in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der angegebenen Temperatur (zumeist 37 °C) gespalten. Zur Spaltung der Plasmid-DNA werden 1-4 U des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Die Zugabe des Enzyms sollte 10 % des gesamten Volumens nicht überschreiten, da ansonsten Sternaktivitäten auftreten können. Die gespaltenen Fragmente können weiterhin für Klonierungen, Transfektionen oder radioaktive Markierungen eingesetzt werden.

4.6.2 Dephosphorylierung

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Um bei einer Ligation eine Autoligation des verwendeten Klonierungsvektors zu verhindern, werden die entsprechenden 5'- oder 3'-Enden zuvor mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine phosphatase*; CIP) dephosphoryliert.

10 x Phosphatase-Puffer: 500 mM Tris/HCl (pH 9); 10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂; 1 mM Spermidin

In einem Reaktionsansatz von 20 µl Endvolumen werden 2 µl 10 x Phosphatase-Puffer und 2-10 pmol überstehende Enden mit 1 U Phosphatase 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 U Enzym wird für weitere 30 min inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung gestoppt (10 min bei 65 °C).

4.6.3 T4-Kinase-Reaktion

Die T4-Kinase phosphoryliert Nukleinsäuren an der freien 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose. Diese Reaktion kann zur radioaktiven Markierung benutzt werden und ist Voraussetzung für die Oligomerisierung von PCR Fragmenten bei nicht phosphorylierten Primern.

10 x Polynukleotid-Kinase-Puffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7.6); 0.1 M MgCl₂; 10 mM EDTA; 50 mM DTT

1-40 pmol dephosphorylierte DNA wird mit 1 µl 10 x Kinase-Puffer, 3.3 µl 3 mM ATP und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U) versetzt. Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wird die Reaktion durch eine 5-minütige Inkubation bei 65 °C gestoppt. Anschließend können nicht inkorporierte Nukleotide und Salze über MicroSpin G-50 Säulen (Amersham) vom Phosphorylierungsansatz abgetrennt werden.

4.6.4 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

In den Fällen, in denen Plasmidvektoren und DNA-Fragmente mit verschiedenen Enzymen verdaut wurden, müssen die unterschiedlichen 5'-kohäsiven Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt werden, um glatte Enden zu erzeugen. Die Klenow-Auffüllreaktion kann auch für eine radioaktive Markierung von Plasmid-DNA genutzt werden.

10 x Klenow-Puffer 100 mM Tris/HCl (pH 8); 500 mM NaCl; 100 mM MgCl₂; 2 mM DTT
dNTP-Mix dATP; dCTP; dTTP; dGTP je 3 mM in Wasser

In einem Reaktionsansatz von 30 µl werden bis zu 1 µg gespaltene DNA mit 2 µl Nukleotid-Mix und 1-2 U des Klenow-Enzyms in 1 x Klenow-Puffer bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1.5 µl 0.2 mM EDTA und Inkubation bei 65 °C (5 min) gestoppt.

4.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Bei der Ligation verknüpft die T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente, die sowohl kompatible, überstehende, als auch glatte Enden besitzen.

Dabei erfolgt eine Phosphodiester-Bindung zwischen den 3'-OH- und den 5'-Phosphatenden der DNA.

10 x Ligase-Puffer:	250 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
(Biolabs)	50 mM	MgCl ₂
	50 mM	DTT
	5 mM	ATP
	25 µg/ml	BSA

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden werden in einem 10 µl Ansatz 0.1-0.2 pmol eines gegebenenfalls zuvor dephosphorylierten Vektors mit 0.2-0.4 pmol eines DNA-Fragments, 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 400-2000 U T4-DNA-Ligase (Biolabs) eingesetzt. Der Ligationsansatz wird für mindestens 2 h bei RT oder 16 °C über Nacht inkubiert. Überstehende, komplementäre Enden werden relativ schnell und vollständig verknüpft, glatte 3'- und 5'-Enden erfordern eine höhere Enzymkonzentration. Bei der Ligation mit synthetischen Oligonukleotiden wird mit der 1000-fach molaren Menge des Fragments ligiert.

4.7 *Polymerase chain reaction (PCR)*

4.7.1 DNA-Amplifikation durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine einfache, effiziente Methode zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen). Ein PCR-Zyklus besteht aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Inkubationsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen: die doppelsträngige DNA wird zunächst bei einer hohen Temperatur denaturiert. Danach erfolgt bei einer niedrigen Temperatur die Bindung der Primer, die komplementär zu den jeweiligen 3'-Grenzen des Zielsegmentes sind. Diese werden anschließend durch eine DNA-Polymerase bei einer intermediären Temperatur verlängert. Die Verwendung von thermostabilen Polymerasen erlaubt die häufige Wiederholung dieses Zyklus ohne erneute Zugabe des Enzyms. In den meisten Fällen wird die so genannte Taq-Polymerase von *Thermophilus aquaticus* verwendet.

Allerdings gibt es noch Reihe anderer Enzyme, die bei speziellen Anforderungen zum Einsatz kommen. So verwendet man Polymerasen, die neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität zusätzlich eine *proof reading* Aktivität (3'-5' Exonukleaseaktivität) besitzen, wenn die Fehlerquote in der Sequenz des Amplifikats sehr gering sein soll. Im *ExpandTM Long Template PCR System* (Roche Pharma) wird ein solches Korrekturleseenzym aus *Thermococcus gorgonarius* (Tgo-Polymerase) neben der oben erwähnten Taq-Polymerase eingesetzt (PolMix). Die generierten PCR-Produkte dieses Enzym-Mix weisen, neben wenigen *blunt end* Fragmenten, hauptsächlich den für Taq-Polymerasen typischen 3' Adenin-Überhang auf.

Da während der PCR theoretisch bei jedem Zyklus nur die betreffende Sequenz verdoppelt wird, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg ihrer Konzentration, so dass am Ende

eine bis zu 10^9 -fache Vermehrung des gewünschten Segmentes erreicht werden kann. Typische Reaktionsansätze für PCR-Reaktionen auf Plasmid- bzw. HMW-DNA setzen sich folgendermaßen zusammen:

Plasmid-*template*: 1-5 μ l Plasmid-DNA [10 ng/ μ l]
 1.5 μ l Primer A [10 pmol/ μ l]
 1.5 μ l Primer B [10 pmol/ μ l]
 3.3 μ l dNTPs [3 mM]
 5 μ l 10 x Puffer 2
 0.5 μ l PolMix
ad 50 μ l H₂O

HMW-*template*: 1.0 μ l HMW-DNA (s. 4.5.4)
 1.5 μ l Primer A [10 pmol/ μ l]
 1.5 μ l Primer B [10 pmol/ μ l]
 2.5 μ l 10 x Puffer 1
 2.0 μ l dNTS [2.5 mM]
 0.5 μ l MgCl₂ [10 mM]
 0.25 μ l PolMix
ad 25 μ l H₂O

Ein typisches Temperaturprofil eines PCR-Programms beginnt mit einem initialen DNA-Denaturierungsschritt (2-5 min bei 94 °C). Anschließend folgt eine Reihe von gleich bleibenden Temperaturzyklen 30 sec 94 °C, 60 sec 20-66 °C und 120-900 sec 68 °C (je nach Länge des Amplifikats). Final schließt das Programm mit einem Extensionsschritt von 10 min bei 68 °C und kühlt dann auf dauerhafte 4 °C ab.

4.7.2 Ortsgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*, SDM)

Die Mutationen in der entsprechenden genomischen Region wird in einer PCR-Reaktion unter Verwendung von sequenzspezifischen Oligonukleotiden eingeführt. Die Planung der Oligonukleotide und Durchführung der ortsgerichteten Mutagenese erfolgt mit dem *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers. Neben diesem Kit kommen für die SDM-Reaktion weitere Polymerasen mit 3'-5' *proof-reading* Exonuclease-Aktivität, wie *PfuTurbo* - (Stratagene) und *Pwo*- DNA Polymerase (Boehringer Mannheim; vgl. 4.7.1) zum Einsatz.

4.7.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgt nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Hierbei werden zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Didesoxynukleotide eingesetzt, die aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe

keine weitere Phosphodiesterbindung ausbilden können und somit zu einem vorzeitigem Kettenabbruch führen.

Neben dem Sequenzierdienst der Arbeitsgruppen Genomanalyse (GNA, Leiter Helmut Blöcker, GBF Braunschweig) werden Sequenzierungen auch mittels *BigDye Termination v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. 0.5-1 µg Plasmid-DNA, 1 µl Primer [10 pmol/µl], 4 µl *ready reaction premix*, 4 µl *BigDye sequencing buffer* werden mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und folgendem PCR-Programm unterzogen:

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| (1) 96 °C - 30 sec Denaturierung | } 24 x |
| (2) 55 °C - 15 sec <i>Annealing</i> | |
| (3) 60 °C - 4 min Extension | |
| (4) 4 °C - ∞ | |

Nach Ablauf des Programms wird die Reaktion mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl 3 M NaAc, pH 4.6 und 250 µl 100 % Ethanol versetzt. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 13000 UpM (RT) wird der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 13000 UpM (RT) für 5 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet für etwa 15 min getrocknet. Final wird das Pellet in 12.5 µl TSR (*template suppression reagent*) aufgenommen, 10 min bei 95 °C aufgeköcht und in Sequenzierröhrchen überführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt an einem Kapillarsequenzierer der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 310 Genetic Analyzer).

4.8 Gelelektrophoresen

4.8.1 Agarose-Gelelektrophorese

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Laufpuffer (TAE):	40 mM	Tris/Acetat (pH 7.5)
	20 mM	NaOAc
	1 mM	EDTA

Färbelösung:	5 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
--------------	--

6 x Ladepuffer:	a)	25 %	Ficoll (w/v)
			Orange G-Indikator (einige mg)
	b)	15 %	Ficoll (w/v)
		10 mM	EDTA
		0.05 %	Bromphenolblau
		0.05 %	Xylencyanol

Zur Anfertigung eines 1 %igen Standardgels wird 1 g Agarose in 100 ml Laufpuffer in der Mikrowelle gelöst. Die flüssige Agarose wird mit 3 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Zur Formung der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wird das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit der entsprechenden Menge an Ladepuffer versetzt. Für die Größenordnung eines Fragments werden Größenstandards parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei ca. 100 V und 30 mA durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente werden die DNA-Banden nach 1-3-stündiger Elektrophorese auf dem Transilluminator unter UV-Licht (360 nm) fotografiert. Für die präparative Gewinnung der DNA-Fragmente werden die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

4.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

4.8.2.1 denaturierende SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel. Das Natrium-Dodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und führt durch seine stark negative Ladung dazu, dass die Proteine negativ geladen vorliegen und deren Eigenladung zu vernachlässigen ist.

Die Proteine werden mit Probenpuffer (8 x PP: 0.25 M Tris/HCl pH 6.8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 20 % β-Mercaptoethanol) versetzt und vor dem Auftragen für 10 min bei 95 °C aufgeköcht, um höhere Strukturen aufzubrechen. Zelltrümmer und andere Aggregate werden mittels Zentrifugation bei 13000 UpM für 5 min entfernt bevor die Proben auf das Gel geladen werden. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 30-40 mA in 1 x Elektrophoresepuffer (3 g Tris/Base; 14.4 g Glycin; 1 g SDS auf 100 ml H₂O) durchgeführt.

Standardrezeptur für 3-4 10 %ige Gele (8 cm x 6 cm):

Trenngel:	4 ml H ₂ O
	2.5 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris/HCl, pH 8.8)
	3.3 ml Polyacrylamid (Fa. Roth; 30 %)
	100 µl 10 % SDS
	40 µl 10 % APS
	10 µl TEMED
Sammelgel:	2.25 ml H ₂ O
	0.95 ml Sammelgelpuffer (0.5 M Tris/HCl, pH 6.8)
	0.45 ml Polyacrylamid (30 %)
	38 µl 10 % SDS
	15 µl 10 % APS
	8 µl TEMED

4.8.2.2 native PAGE

In nativen Gelen wird das Laufverhalten von Proteinen nicht nur durch ihre jeweilige Ladung, sondern vor allem durch die Konformation und Masse bestimmt, zu der auch die Assoziation mit weiteren Proteinen signifikant beiträgt. Daher muss die Prozentigkeit des Gels je nach zu untersuchendem Protein bzw. Proteinkomplex angepasst werden. In dieser Arbeit wird die native PAGE ausschließlich für EMSA-Studien (s. 4.9.3) eingesetzt.

4.8.3 Trocknung von Polyacryamidgelen

Zur permanenten Aufbewahrung werden die Gele 1-2 h in Trocknerlösung (50 % Methanol (v/v), 3 % Glycerin (v/v)) inkubiert und anschließend in einen Rahmen zwischen Zellophanfolien (*Gel Air Cellophane Support*, BioRad) gespannt und getrocknet.

Für EMSA-Studien hingegen werden die radioaktiven Gele auf 2 Lagen Whatmann-3MM-Filterpapier transferiert, mit einer Frischhaltefolie luftblasenfrei bedeckt und auf einem Geltdrockner 30 min bei 60 °C getrocknet. Anschließend können die Gele in Expositionskassetten überführt werden.

4.9 Radioaktive Nachweismethoden

4.9.1 DNA-Markierung mit dem „*Rediprime DNA Labelling System*“

Labelling Mix (Amersham Life Science): dATP; dGTP; dTTP; exonukleasefreies Klenow-Enzym; Oligonukleotidprimer (9-mer)

25-50 ng DNA werden in einem Endvolumen von 45 µl in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß für 5 min bei 100 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz in den *Labelling Mix* pipettiert, gemischt und nach Zugabe von 5 µl α [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) für ca. 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0.5 M EDTA gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide werden über eine MicroSpin G-50 Säule (Amersham) abgetrennt.

4.9.2 Southern Blotting

(Southern, 1975)

Diese Nachweismethode dient beispielsweise der qualitativen und quantitativen Überprüfung von Transgenintegrationen in genomische DNA. 10 µg der gereinigten, hochmolekularen DNA werden mit 2 µl des jeweiligen 10 x Restriktionspuffers, 0.5 µl TE/RNase [10 µg/ml] sowie 20 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease versetzt und über Nacht in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei der spezifischen Temperatur des Enzyms inkubiert. Danach wird die DNA direkt mit 5 µl 6 x Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 0.8-1.5 %-igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard wird ein mittels Klenow-Enzym ³⁵S-markierter λ -DNA Verdau verwendet. Bei all diesen Schritten ist es wichtig, auf eine intensive Durchmischung der eingesetzten, teilweise viskosen Lösungen zu achten.

Der Transfer der DNA vom Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-XL Membrane, Amersham) erfolgt mit 0.4 M NaOH. Lange DNA-Fragmente (> 5 kb) können vor dem Transfer mittels 0.25 M HCl (ca. 30 min) depurinieren werden, so dass sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen und leichter aus dem Gel heraustreten können. Das Gel wird anschließend mit 0.4 M NaOH neutralisiert und in eine Blotapparatur überführt: das Gel liegt mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatmann 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0.4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier sollten mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Kontakt kommen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt, die zuvor in 0.4 M NaOH gewässert wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0.4 M NaOH angefeuchtete und eine Lage trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. *Tork*) die Anordnung ab. Die Apparatur wird vorsichtig mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Der Transfer sollte mindestens 6 h, meist jedoch über Nacht erfolgen. Anschließend wird die Nylonfolie in 2 x SSC (20 x SSC: 175.3 g/l NaCl; 100.5 g/l Tri-Natriumcitrat x 2H₂O) neutralisiert und 2 h bei 80 °C gebacken. Nach dem Backen kann die Membran zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Hybridisierung und Waschen:

Hybridisierung mit Dextransulfat-Hybridisierungslösung:

Hybridisierungslösung: 1 M NaCl
 50 mM Tris, pH 7.5
 10 % Dextransulfat
 1 % SDS
 250 µg/ml *salmon sperm* DNA (sonifiziert)

Waschlösung: 2 x SSC/0.5 %SDS und/oder 1 x SSC/0.1 % SDS

Prähybridisierung und Hybridisierung:

20 ml der Hybridisierungslösung werden bei 65 °C aufgetaut, für 10 min aufgeköcht und wieder auf 65 °C abgekühlt. Die Lösung wird in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungsofen gefüllt, und die zuvor mit H₂O angefeuchtete Membran mit der DNA-freien Seite Richtung Glaswand eingeführt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 65 °C im Hybridisierungsofen für mindestens 1 h. Anschließend wird die denaturierte, radioaktiv-markierte DNA-Sonde hinzugefügt und die Hybridisierung über Nacht bei gleichen Bedingungen fortgesetzt. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht zerstört werden und die Membranrückseite sollte nach Möglichkeit immer luftblasenfrei an der Glaswand anliegen.

Waschen:

Der Röhrcheninhalt wird in den Radioaktivmüll entleert und die Membran vorsichtig entnommen. Anschließend wird, wie folgt, gewaschen:

- | | | | |
|------|---------------------------------------|--------|-------|
| 1. | 2 x SSC/0.5 % SDS (ca. 250 ml) | 5 min | RT |
| 2. | 2 x SSC/0.5 % SDS (ca. 500-1000 ml) | 30 min | 65 °C |
| 3. | 2 x SSC/0.5 % SDS (ca. 250-500 ml) | 5 min | 65 °C |
| | (bei zu erwartendem schwachen Signal) | | |
| oder | 1 x SSC/0.1 % SDS (ca. 250-500 ml) | 30 min | 65 °C |
| | (bei zu erwartendem starken Signal) | | |

Final kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden. Trocknung der Membran führt zu irreversibler Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich.

Rehybridisierung:

Zur Rehybridisierung wird die Aktivität durch Waschen unter den für die benutzte Membran angegebenen *strip*-Bedingungen entfernt. Für Hybond-XL Membranen wird kochendes 0.5 %iges SDS in 0.1 x SSC auf die Membran gegeben und bei RT geschüttelt, bis die Lösung abgekühlt ist. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch anschließende Exposition überprüft. Erneute Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgen wie zuvor beschrieben.

4.9.3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

(modifiziert nach Roder und Schweizer, 2001)

Der EMSA, auch *gel-shift assay* genannt, ist eine schnelle, extrem sensitive, technisch recht einfache und weit verbreitete Methode zur Untersuchung von Nukleinsäure-Protein Interaktionen. Das System basiert auf der Beobachtung, dass Proteinbindung an DNA- oder RNA-Fragmente gewöhnlicherweise zu einer verminderten elektrophoretischen Mobilität dieser Fragmente in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel führt. Hauptsächlich ist die negative Ladung der Nukleinsäure für das Laufverhalten im Gel verantwortlich, doch auch die Eigenladung, Struktur und Masse der Proteine bzw. Proteinkomplexe kann maßgeblichen Einfluss auf das Migrationsverhalten haben. Weitere, kritische Parameter, die die Protein-DNA Interaktion signifikant beeinflussen können sind Salzkonzentrationen und -zusammensetzung des Bindungspuffers, Kompetitor-DNA-Konzentrationen (poly [dI-dC] als unspezifischen Doppelstrangkompetitor und unspezifische Einzelstrangkompetitoren) sowie deren Längen, Proteingehalt der Kernextrakte, die Temperatur bei der Formierung der Komplexe, die Konzentration des Acrylamidgels bzw. dessen ionische Zusammensetzung und neben der Ionenstärke des Elektrophoreselaufpuffers auch die Temperatur während des Gellaufs.

EMSA-Gele sind in der Regel zwischen 4-8 %ig. Generell gilt, je höher die Acrylamidkonzentration des Gels, desto schärfer die *shifts* der entsprechenden Komplexe. Die Rezeptur für zwei 8 %ige Standardgele setzt sich folgendermaßen zusammen:

Polyacrylamid (30 %)	13.3 ml
10 x TBE (1L: 100 g Tris/Base; 55.6 g Borsäure; 9.3 g EDTA)	2.5 ml
H ₂ O	34.2 ml
10 % APS	0.5 ml
TEMED	0.1 ml

Die hohe Sensitivität des EMSAs liegt in der Verwendung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden, die es erst ermöglichen DNA-Bindung gering exprimierter Proteine, wie die meisten Transkriptionsfaktoren (TF), nachzuweisen.

Hierzu wird 1 pmol Oligonukleotid-DNA mit 1 µl 10 x Kinase-Puffer (vgl. 4.6.3), 1-2 µl γ [³²P]dATP (3000 Ci/mmol) und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U) versetzt. Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Nach 30 min Inkubation wird die Reaktion durch eine 5-minütige Erwärmung auf 65 °C gestoppt. Anschließend können nicht inkorporierte Nukleotide und Salze über MicroSpin G-50 Säulen (Amersham) vom Kinasierungsansatz abgetrennt werden. Die Effizienz der Markierung kann mittels Scintillationszähler ermittelt werden [cpm/µl].

Um doppelstrangbindende Proteine untersuchen zu können, müssen komplementäre, markierte Oligonukleotide, falls man nicht mit PCR-Produkten oder gereinigten Doppelstrang-oligonukleotiden arbeitet, vor dem Start des Experiments *annealed* werden. Dazu vereinigt man äquimolare Mengen der komplementären Oligonukleotide, kocht diese 5 min bei 95 °C auf, bevor sie für einen Zeitraum von etwa 2 h im Thermoblock bis RT abgekühlt werden.

Die eigentliche Bindungsreaktion setzt sich standardmäßig aus 10-15 µg Kern-extraktproteinen, 5 µl 5 x Bindungspuffer (50 mM HEPES, pH 8.0; 25 mM MgCl₂; 250 mM KCl; 10 % Ficoll (w/v); 0.025 % Bromphenolblau (w/v); 0.025 % Xylencyanol (w/v)); 1 µg polyIC (1000-fach molarer Überschuss); 200-fach molarer Überschuss an unspezifischem Einzelstrangkompetitor und etwa 50 fmol DNA-Sonde zusammen. Der Gesamtreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl wird im Rahmen dieser Arbeit stets für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Verwendung von gereinigtem Protein und/oder Antikörpern (EMSA-*supershift*) kann hierbei zu geringfügigen Modifikationen führen.

Das Gel wird vor dem Auftragen der Proben für etwa 30-45 min bei 60-70 V einem Vorlauf unterzogen. Der eigentliche Gellauf variiert je nach Sondenlänge und Prozentigkeit des Gels und beträgt beispielsweise für 50-mer Sonden in einem 8 %igem Gel etwa 4 h bei konstanten 140 V. Anschließend wird das Gel auf 2 Lagen 3MM Whatmann-Filterpapier transferiert, mit Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und 30 min bei 60 °C auf einem Gel-trockner getrocknet. Final wird das Gel in eine Expositionskassette überführt und je nach Stärke der Sonden für mehrere Stunden oder Tage exponiert. Das Autoradiogramm wird mit-hilfe eines *Phospho-Imager* eingescannt.

4.10 Arbeiten mit eukaryontischen Zellsystemen

4.10.1 Arbeiten mit Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) – *Yeast One-Hybrid System*

Das *Yeast One-Hybrid System* dient zur Suche nach spezifisch DNA-bindenden Proteinen für eine definierte DNA-Sequenz. Die Targetplasmide dieses Systems basieren auf verschiedenen Reportergenkonstrukten (β -Galaktosidase (*LacZ*) bzw. Histidin), die unter Kontrolle eines Minimalpromotors stehen. Direkt vor diesem Promotor wird die zu untersuchende DNA-Sequenz, via Insertion in eine entsprechende *multiple cloning site* (MCS), eingebracht.

Werden diese Plasmide stabil in das Hefegenom integriert und für das *screening* geeignete Klone charakterisiert (geringe *background*-Aktivität des Promotors bezüglich des Reportergens), können anschließend entsprechende cDNA-Banken auf DNA-bindende Proteine hin untersucht werden. Diese cDNA-Banken kodieren für Fusionsproteine aller Art, die jeweils eine Aktivierungsdomäne tragen. Im Falle einer erfolgreichen DNA-Protein Interaktion regt diese den Minimalpromotor zur Transkription des Reportergens an und ermöglicht somit eine Selektion potentieller Kandidaten.

4.10.1.1 Lösungen und Medien

Stocklösungen:

1 M 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT; Sterilfiltration)

40 % Glucose (autoklavieren)

10 x *drop out solution* (DOS): beispielsweise
„-LEU/-URA“

L-Adeninhemisulfatsalz 200 mg/l

L-Arginin HCl 200 mg/l

L-Histidin HCl x 1H₂O 200 mg/l

L-Isoleucin 300 mg/l

L-Lysin HCl 300 mg/l

L-Methionin 200 mg/l

L-Phenylalanin 500 mg/l

L-Threonin 2000 mg/l

L-Tryptophan 200 mg/l

L-Tyrosin 300 mg/l

L-Valin 1500 mg/l

(autoklavieren)

50 % PEG 3350 (autoklavieren)

10 x TE (0.1 M Tris/HCl; 10 mM EDTA; pH bei 7.5;
autoklavieren)

10 x LiAc (1 M LiAc, pH 7.5 mit Essigsäure; auto-
klavieren)

100 % steriles DMSO (Sigma)

Heringssperma-DNA [10 mg/ml]

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid in DMF [20 mg/ml]; Lagerung bei -20 °C)

Lösungen:

Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	16.1 g/l
	NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O	5.5 g/l
	KCl	0.75 g/l
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.246 g/l
	(pH auf 7.0 einstellen und autoklavieren)	

Medien:

SD-Medium 6.7 g *Yeast Nitrogen Base without amino acids* mit H₂O auf 850 ml auffüllen (für Kulturplatten zusätzlich 20 g/l Agar); autoklavieren. Anschließend Zugabe von sterilen 100 ml 10 x DOS, 50 ml 40 % Glucose und evtl. 3-AT oder andere Additive.

YPD-Medium 20 g Difco-Pepton und 10 g Difco-Hefeextrakt mit 950 ml H₂O versehen (für Kulturplatten zusätzlich 20 g/l Agar); autoklavieren; Zugabe von steriler 40 % Glucose (mindestens 2 % Endkonzentration).

4.10.1.2 Verwendete Hefe-Stämme

YM4271:	MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-901, tyr1-501, gal4- Δ 512, gal80- Δ 538, ade5::hisG (Liu <i>et al.</i> , 1993; Wilson <i>et al.</i> , 1991)
YM4271HISi-1sE7/LacZisE7/18 (Nr.6 ₂):	Wie YM4271, zusätzlich aber mit stabil integriertem pHISi-1sE7 und pLacZisE7/18 Konstrukt (s. 4.2.7).

4.10.1.3 Kultivierung von Hefen

Die Hefezellen werden in einem Brutschrank bei 30 °C kultiviert. Niedrigere bzw. höhere Temperaturen wirken sich hemmend auf das Wachstum und die Proliferation aus. YPD-Medium inkl. 2-5 % Glucose dient als Standardmedium für Hefen. Als Verbrauchsmarker des Kulturmediums dienen die Hefen selbst, da sich ihre Farbe von weiß/gelb nach rot verändert, wenn sich die Kulturbedingungen verschlechtern (Glucoseabbau). Nach spätestens einwöchiger Kultivierung sollten man die Hefen überimpfen.

4.10.1.4 Transformation von Hefen

Hefezellen können auf verschiedene Art und Weise transformiert werden. Neben der Elektroporation hat sich die chemische Transformation mit Lithiumacetat bewährt. Letztere (*small scale LiAc yeast transformation procedure*) startet mit einer 50 ml Vorkultur. Hierzu werden mehrere 2-3 mm große Kolonien in 1 ml YPD plus 4 % Glucose (YPD+Glu) überführt und bis zu 5 min gevortext, bis alle Klumpen beseitigt sind. Anschließend wird die Hefesuspension in 50 ml YPD+Glu pipettiert und für etwa 17 h bei 30 °C und 250 UpM schüttelnd inkubiert ($OD_{600} > 1.5$). Am nächsten Tag werden 300 ml YPD+Glu mit etwa 30 ml der Übernachtskultur beimpft. Die OD_{600} dieser Verdünnung sollte zwischen 0.2 und 0.3 liegen. Anschließend wird die Kultur 3-4 h bei 30 °C und 230 UpM inkubiert, bis eine OD_{600} von 0.4 bis 0.6 erreicht ist. Diese, sich in der logarithmischen Wachstumsphasen befindlichen Hefen, werden auf 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt und in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor 5 min bei RT und 1000 x g pelletiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen, die Hefen in 9 ml 1 x TE resuspendiert und vereinigt. Eine weitere Zentrifugation wie zuvor trennt erneut die Zellen vom Überstand. Letzterer wird nahezu vollständig abgenommen. Das Hefepellet wird in 1.5 ml frisch angesetztem 1 x TE/LiAc in H₂O vollständig resuspendiert. Dieser Schritt macht die Hefezellen kompetent für die anschließende DNA-Aufnahme. Dazu werden 0.1 µg zirkuläre Plasmid-DNA (transient) oder 1-4 µg entsprechend linearisierte Plasmid-DNA (stabil) mit 0.1 mg Heringssperma-DNA in ein frisches 1.5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt, 100 µl kompetente Hefenzellen zugeführt und 5 sec gründlich gevortext. Zuletzt werden 600 µl steriles PEG/LiAc/TE (1 ml enthält 800 µl 50 % PEG; 100 µl 10 x LiAc und 100 µl 10 x TE) dazugegeben und für 10 sec bei *full speed* gevortext. Dieser Reaktionsansatz wird für 30 min bei 30 °C und 200 UpM inkubiert. Zugabe von 70 µl DMSO, mehrfaches invertieren und 15-minütiger Hitzeschock bei 42 °C mit anschließendem Abkühlen auf Eis (2 min), führt zur Aufnahme der DNA in die Zellen. Nach kurzem Zentrifugieren (5 sec, 13000 UpM) wird der Überstand entfernt, das Hefepellet in 150 µl 1 x TE resuspendiert und auf einer entsprechenden Selektionsplatte (SD-Platte mit entsprechender DOS) ausgestrichen. Die Transformationsansätze werden 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.10.1.5 Selektion und Reporter-Test (*lift filter assay*)

Die nach einer stabilen Transformation erhaltenen Kolonien sollten mindestens zweimal nacheinander auf frische Selektionsplatten ausgestrichen werden, um Zellen mit nicht ins Genom integrierten Konstrukten (falsch-positive Klone) zu entfernen, da die transformierte, extrachromosomale DNA nicht repliziert werden kann. Die Integration erfolgt über homologe Rekombination. Dabei werden defekte Loci (Hefestamm YM4271), entweder für die Uracil- oder Histidin-Synthese (Integrationsmarker), im Hefegenom rekonstituiert und die Hefezellen können auf Selektionsplatten, SD minus URA oder SD minus HIS, wachsen (s. pLacZi bzw. pHISi-1, 4.2.7). Einmal ins Genom integrierte Konstrukte, die neben dem Integrationsmarker auch die zu testende DNA-Erkennungsregion mit nachgeschaltetem Reportgenkonstrukt tragen, verbleiben dort auch ohne weiteren Selektionsdruck für mehrere Wochen. Um ein

nachträgliches Ausschleusen der Konstrukte zu vermeiden, sollten die Hefen von Zeit zu Zeit wieder auf entsprechende Selektionsplatten ausgestrichen werden.

Für einen Reporter-Test wird zirkuläre DNA (transiente Transformation) in die Zellen eingebracht, die in der Regel nicht stabil ins Genom aufgenommen wird. Diese verbleibt, mit entsprechendem eukaryontischen *origin of replication* (ori) ausgestattet, extrachromosomal und kann im Falle von pGAD424 auf SD minus LEU2 Platten selektiert werden (s. 4.2.7). Wird eine zu untersuchende cDNA in dieses Plasmid kloniert, kann das daraus resultierende Protein-AD-Fusionsprodukt auf DNA-Bindung an die stabil integrierte Test-DNA-Sequenz überprüft werden. Als Reporter-Test dient der so genannte *lift filter assay*, mit dessen Hilfe der Substratumsatz (X-Gal) von β -Galaktosidase visualisiert werden kann. Hierzu werden die Hefezellen, die neben der stabil integrierten Test-DNA-Sequenz auch das zu untersuchende Protein-AD-Fusionsprodukt exprimieren, auf einen Rundfilter gestempelt. Zum Aufbrechen der Zellen wird der Filter dreimal abwechselnd für 30 sec in flüssigen Stickstoff getaucht bzw. bei RT belassen. Anschließend wird der Rundfilter in eine 100 mm Petrischale überführt, in welcher sich bereits ein zweiter Rundfilter befindet der zuvor mit 1.5 ml X-Gal Reaktionslösung (5 ml Z-Puffer, 14 μ l β -Mercaptoethanol und 84 μ l X-Gal-Lösung) überschichtet worden ist. Die Schale wird nun bei 30 °C inkubiert, bis sich bei erfolgreicher DNA-Protein Interaktion, die Hefezellen blau verfärben.

4.10.2 Arbeiten mit Säugerzellen

4.10.2.1 Zelllinien

LM(Tk):	Maus-Fibroblasten-Zelllinie, Derivat der L929-Zelllinie; erhalten von M. Wigler; stabile Linie mit defektem Thymidinkinasegen, keine Spontanrevertanten (Kit <i>et al.</i> , 1963) und BUdR (5-Bromo-2-Deoxyuridin-Resistenz), <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC) No. CCL-1.3
MG63:	Humane Osteosarcomazelllinie (ATCC CRL1429)
Vero:	Nebennieren-Zelllinie vom Affen mit defektem Interferon-Locus (ATCC CCL-81)
2 ₄ :	klonale Linie von mit pCosIFN β und pHc79 2cos/tk kotransfizierten Ltk ⁻ Zellen; enthält 100 Kopien der IFN- β Domäne (Hauser, 1982)
CHO-AT III:	Klon SS3-A2; Suspensionszelllinie, erhalten von C. Wiendahl, AG ZKT

4.10.2.2 Medien und Lösungen

PBS	137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 1.47 mM KH ₂ PO ₄ (pH 6.8-7.0) mit 1 N NaOH einstellen; bei 4 °C lagern.
TEP	0.1-0.2 % Trypsin-EDTA (Fa. Gibco) in PBS

Penicillin/Streptomycinlösung (100 x) 1.212 g Ampicillin/200 ml (10.000 U/ml); 2 g Streptomycin/200 ml (10 mg/ml); zum Lösen mit NaOH auf pH 7.4 einstellen; bei -20 °C lagern.

Glutaminlösung (100 x) 29.23 g Glutamin in 1 l H₂O lösen; bei -20 °C lagern.

DME-Medium (Dulbecco's Modification of Eagles Medium)

10 l Steilbrustflaschen werden mit der erforderliche Menge Pulvermedium (DME-Pulver von Fa. Flow) befüllt. Nach Zugabe des entsprechenden Volumens an Milliporewasser wird das Pulver unter ständigem Rühren komplett gelöst. Anschließend wird das Medium mit 1/100 l M HEPES (v/v) und 3.75 g/l NaHCO₃ komplettiert und in sterile Flaschen filtriert. Die Flaschen werden daraufhin zwei Tage bei RT inkubiert, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen. Eine längerfristige Lagerung erfolgt bei 4 °C. Wenn nicht anders beschrieben, wird dem Medium kurz vor Gebrauch 10 % FCS, 1/100 Glutaminlösung (v/v) sowie 1/100 Penicillin/Streptomycinlösung (v/v) zugesetzt.

4.10.2.3 Kultivierung von Zelllinien

Die fermentierbaren CHO-Zellen werden in SMIIF 6 Medium (Gibco) bei 40 UpM in einer 500 ml Spinnerflasche (Techne) auf einem Spinnertableau rührend kultiviert (37 °C, CO₂-Konzentration: 12 %). Dem gegenüber werden LM(Tk⁻)-, Vero-, MG63- und 2₄-Zellen bei 37 °C und 5 % in einem nassbegasteten Brutschrank inkubiert. Für die zuletzt aufgeführten Zelllinien wird DME-Medium mit 10 % FCS, 20 mM Glutamin, 60 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Je nach Zelldichte sollte alle 2-5 Tage das Medium gewechselt werden. Sind die Zellen konfluent, werden sie umgesetzt (passagiert).

4.10.2.4 Passagierung

Die zu passagierenden Zellen werden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit einem dünnen Film TEP überschichtet. Nach einigen Minuten lösen sich die Zellen von der Oberfläche. Die Zellsuspension wird zur Inaktivierung des Trypsins in mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Medium aufgenommen. Gegebenenfalls wird ein Aliquot der Zellsuspension gezählt und die Zellen in der gewünschten Konzentration in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium ausgesät.

4.10.2.5 Langzeitlagerung von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen einer kleinen Flasche (ca. 3×10^6 Zellen) werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEP abgelöst. Die Zellsuspension wird in 4 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 2 ml kaltem FCS mit 5% DMSO resuspendiert und auf 3-4 Einfrierröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) aliquotiert und sofort auf Eis gestellt. Man belässt die Röhrchen maximal 60 min auf Eis, verpackt sie in Zellstoff und lagert sie in Styroporkästen bei -70 °C.

Nach etwa 12 h können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden. Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Dazu erwärmt man die Röhrchen im 37 °C Wasserbad und nimmt die Zellsuspension in 10 ml Medium auf, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wird 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine kleine Flasche überführt.

4.10.2.6 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion ist eine Methode zum Einbringen von Fremd-DNA in kultivierte Säugerzellen. Zahlreiche verschiedene Methoden haben sich im Laufe der Jahre etabliert. Klassisch wird die DNA über Calciumphosphatpräzipitation (Phagozytose) in Zellen eingeschleust. Modernere Verfahren hingegen sind die Lipofektion und die Elektroporation. Während bei der Lipofektion DNA-beinhaltende Micellen mit der Plasmamembran von Zellen fusionieren, werden im Falle der zuletzt genannten Methode DNA-Moleküle mittels eines kurzen elektrischen Impulses in die Zielzellen eingebracht.

4.10.2.6.1 Transfektion von Säugerzellen mittels Lipofektion

In dieser Arbeit wird ausschließlich das Lipofektionsreagenz Metafecten (Fa. Biontex) verwendet: Zur Transfektion von $1-4 \times 10^5$ Zellen auf einer 6-well Platte (Gesamtvolumen: 2 ml serumhaltiges Medium) werden zwei getrennte Lösungen in 1.5 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Alle Komponenten werden zuvor auf RT erwärmt. Lösung A besteht aus 0.4-5 µg zu transfizierende DNA in 100 µl serumfreien Medium, während sich Lösung B aus 2-35 µl Metafectene in 100 µl serumfreien Medium zusammensetzt. Zunächst wird Lösung B vorbereitet und durch langsames auf- und abpipettieren vermischt. Anschließend wird Lösung A hergestellt und schnellstmöglich in Lösung B überführt, um Adsorptionsverluste der DNA am Behältnismaterial zu minimieren. Beim Vereinigen der beiden Ansätze sollte mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert werden, bevor der Gesamtansatz für 15-20 min bei RT ruhig stehen gelassen wird. Nach diesem Schritt wird der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und für etwa 24 h, bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wird ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen, je nach Expressionsdauer des transfizierten Konstruktes, 24-72 h weiter im Brutschrank inkubiert.

4.10.2.6.2 Transfektion von Säugerzellen mittels Elektroporation

Je nach Elektroporationsansatz wird das zu transfizierende Plasmid linearisiert oder gegebenenfalls zirkulär verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit werden ausschließlich linearisierte Plasmide für die Elektroporation eingesetzt, da diese vorzugsweise als Einzelkopien in das Wirtsgenom integrieren.

Logarithmisch wachsende, halbkonfluente Zellen werden mit TEP abgelöst, gezählt und in serumhaltigem Medium in einer Konzentration von $1-3 \times 10^6/800$ µl aufgenommen. Die Zellsuspension wird in ein steriles Röhrchen überführt und mit der zu transfizierenden Menge an Plasmid (2-20 µg) vermischt. Anschließend wird der Ansatz in eine sterile 0.4 cm Elektroporationskuvette pipettiert, die Kuvette in die Elektroporationskammer gestellt und die vorher

ausgetestete, optimale Stromstärke und Spannung angelegt. Geeignete Elektroporationsbedingungen für LM(Tk⁻)-Zellen sind 500 μ F und 250 V/cm. Direkt nach der Elektroporation wird die Küvette 5 min auf Eis aufbewahrt bevor die behandelten Zellen mit Kulturmedium verdünnt (1/10-1/20) und auf einer 100 mm TC-Platte ausgesät werden. Nach 24 h erfolgt der erste Mediumwechsel gegen Selektionsmedium.

4.10.2.7 Durchführung einer Selektion

In der Regel wird das Medium einen Tag nach der Transfektion gewechselt. Am nächsten Tag werden die Zellen optional umgesetzt (mindestens eins zu drei verdünnt) und mit Selektionsmedium versetzt, welches alle 2-3 Tage erneuert wird. Klone erscheinen je nach Selektion und Zelltyp 8-21 Tage (bei LM(Tk⁻)-Zellen nach etwa 10 Tagen) später. Die Klone werden, wenn sie Stecknadelkopfgröße erreicht haben, auf der Plattenrückseite mit Hilfe eines Filsstifts markiert, gezählt und die Zählung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend können die einzelnen Klone mit TEP abgelöst, in Selektionsmedium abgestoppt, resuspendiert und auf einer kleinen Zellkulturflasche (25 cm²) ausgesät werden (stabiles Klongemisch). Am nächsten Tag sollte das Medium erneuert werden, um Zelltrümmer zu entfernen. Die zur Selektion verwendeten Drogenkonzentrationen sind vom Zelltyp abhängig und müssen vorher ausgetestet werden. Typische Konzentrationen für eine Neomycin (G418)-Selektion bei LM(Tk⁻)-Zellen liegen zwischen 800-1000 μ g/ml Medium.

4.10.2.8 Virusinduktion

Der IFN- β Promotor ist in nicht-induzierten Zellen nahezu ruhig gestellt, kann aber durch Zugabe verschiedenster Stimuli (poly [rI]:poly[rC], ds RNA oder Viren) aktiviert werden. Dieses gilt sowohl für den endogenen IFN- β Promotor, als auch für artifizielle Reporter-genkonstrukte, die unter der Kontrolle des IFN- β Promotors stehen.

4.10.2.8.1 Virusinduktion stabiler Klongemische

Für eine Virusinduktion mit NDV (*newcastle disease virus*) werden 2.5×10^5 Zellen eines entsprechenden stabilen Klongemisches in einer 6-well Platte ausgesät. 48 h später werden die Zellen zunächst zweimal mit PBS und anschließend zweimal mit serumfreiem DME-Medium gewaschen. Pro zu induzierendem Ansatz wird 1 ml NDV-Suspension (NDV 1/1600 in serumfreiem DME-Medium) zu den Zellen gegeben und 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Virusinduktion durch dreimaliges Waschen mit serumhaltigem DME-Medium abgestoppt. Anschließend werden die Zellen mit Selektionsmedium überschichtet und weitere 24 h bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt.

4.10.2.8.2 Virusinduktion nach transienter Expression

Für eine Virusinduktion nach transienter Expression werden zunächst $1-2 \times 10^5$ Zellen auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt und 4 h später eine Transfektion, wie unter 4.10.2.6.1 beschrieben, durchgeführt. Nach 24 h wird das

Transfektionsmedium gegen frisches Medium ausgetauscht. Die Zellen werden weitere 48 h inkubiert, bevor eine Virusinduktion durchgeführt wird (s. 4.10.2.8.1).

4.10.2.8.3 Interferon Test

Die Zellen einer nahezu konfluenten 6-*well* Platte werden, wie unter 4.10.2.8.1 beschrieben, mit NDV induziert. Nach 24 h Inkubationszeit wird 1 ml Zellkulturüberstand abgenommen und der Interferontiter, wie folgt, bestimmt:

Färbelösung: 50 g Kristallviolett; 8.5 g NaCl; 143 ml 37 %iges Formaldehyd; 500 ml Ethanol; mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Vero-Zellen werden auf Microtiterplatten in DME-Medium in einer Konzentration von etwas 1000 Zellen/Loch ausgesät, so dass die Platten am nächsten Tag konfluent bewachsen sind. Die zu testenden Überstände werden neben einem Interferonstandard (Konzentration: 500 U/ml) in die oberste Reihe der Platten gegeben. In den Folgereihe werden 1:1 Verdünnungsstufen der Überstände und des Standard angelegt. Nach 24 h wird das Medium entfernt und je 100 µl einer Virussuspension (DME-Medium mit 5 % FCS, 1/30000 VSV (*vesicular stomatitis virus*)) pro Loch der Microtiterplatten auf die Zellen gegeben. Die durch Virusinfektion ausgelöste Lyse kann nach weiteren 24 h unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Der Virusüberstand wird abgenommen und mit 2.5 %igem Formaldehyd inaktiviert. Die durch Interferon geschützten, noch lebenden Zellen werden mit der Kristallviolett-Färbelösung angefärbt. Durch den Vergleich mit dem Interferonstandard wird der Interferontiter der Überstände bestimmt.

4.10.2.9 *In vitro* – Translation mit Reticulocyten-Lysat aus Kaninchen

Die *in vitro*-Translation von *in vitro* transkribierter RNA lässt sich in Reticulocyten-Lysat aus Kaninchen (RRL) durchführen. Dieses Lysat ist in verschiedenen Ausführungen im Handel erhältlich. Es gibt komplette Systeme und welche, bei denen alle oder nur bestimmte Aminosäuren depletiert sind. Soll ein neu translatiertes Protein direkt und ohne weitere Anfärbung in SDS-Proteingelen sichtbar gemacht werden, kann [³⁵S]-Methionin oder [³⁵S]-Leucin zum Reaktionsansatz gegeben werden. Ist in dem Reticulocyten-Lysat gerade diese Aminosäure depletiert, so sind alle Stellen des Auftretens dieser Aminosäure im Protein markiert, andernfalls nur einige.

Ein gekoppeltes Transkriptions-/Translationssystem (TNT[®] *Coupled Reticulocyte Lysate System*) wird von der Firma Promega angeboten. Hierbei wird die zirkuläre Plasmid-DNA direkt in das Lysat pipettiert und anschließend direkt transkribiert und translatiert.

Ein Translationsansatz für das von Promega vertriebene „TNT[®] *Coupled Reticulocyte Lysate System*“ zur Herstellung nicht-radioaktivmarkiertem Proteins erfolgt folgendermaßen:

TNT [®] Kaninchen-Reticulocyten-Lysat	25 µl
TNT [®] Reaktions-Puffer	2 µl
TNT [®] RNA-Polymerase (T7)	1 µl
Aminosäure-Mix minus Methionin, 1mM	0.5 µl
Aminosäure-Mix minus Leucin, 1mM	0.5 µl
RNasin [®] (33 U/µl; Promega)	1.2 µl
DNA-Template (0,5 µg/µl)	2 µl
H ₂ O	17.8 µl

Die Inkubation findet 90 min bei 30 °C statt. Im Anschluss werden 5-10 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren. Eine Verifizierung des *in vitro* translatierten Proteins kann mittels Western- oder EMSA-Analyse durchgeführt werden.

4.11 Proteinanalytik

4.11.1 Präparation von Zellkernextrakten

Zur Untersuchung von DNA-bindenden Proteinen werden cytoplasmatische und nukleäre Proteinen voneinander getrennt. Für die Isolierung und den Aufschluss von Roh-Nuclei, bezüglich der Gewinnung von Zellkernextrakten, stehen verschiedenste Protokolle zur Verfügung. Im Folgenden werden zwei, von der Handhabung her recht einfache, Protokolle vorgestellt:

4.11.1.1 *Small-scale* Protokoll

Für die Herstellung von nukleären Extrakten in kleinerem Maßstab ($1-3 \times 10^7$ Zellen) wird das *Nuc Buster Protein extarction Kit* (Fa. Novagen) angewandt. Dieses System wurde für schnelle, effiziente und daher gut vergleichbare Präparation von Kernextrakten aus eukaryontischen Zellkulturzellen entwickelt. Es setzt sich aus zwei aufeinander abgestimmten Extraktionspuffern, Proteaseinhibitormix und dem reduzierendem Agens Dithiothreitol (DTT) zusammen. Das ganze Protokoll kann in einem Reaktionsgefäß, ohne Dialyseschritt, durchgeführt werden und liefert innerhalb von 30 min Kernproteine, die für fast alle Aktivitätstests und EMSA-Studien eingesetzt werden können. Das Protokoll wird ohne weitere Modifikationen nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.11.1.2 *Large-scale* Protokoll

(nach Andrews und Faller, 1991)

Ursprünglich als schnelle Mikropräparationstechnik zur Extraktion von DNA-bindenden Proteinen aus geringen Zellzahlen entwickelt, hat sich dieses Protokoll als bestens geeignet für *large-scale* Kernextraktpräparationen erwiesen (Zellzahlen $\geq 3 \times 10^{10}$, vgl. Dignam *et al.*, 1983) Größter Vorteil neben der einfachen Handhabbarkeit ist die Tatsache, dass alle Gebrauchslösungen sehr einfach herzustellen sind.

1×10^7 Zellen werden nach ihrer Ernte zunächst einmal in 10 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend 5 min bei 1000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wird daraufhin in 400 µl kaltem Puffer A (10 mM HEPES/KOH, pH 7.9; 1.5 mM MgCl_2 ; 10 mM KCl; 0.5 mM DTT; 0.2 mM PMSF; inkl. Proteaseinhibitormix) resuspendiert und 10 min auf Eis einer hypotonischen Lyse unterzogen. Nach Vortexen für 10 sec bei *full speed* wird der Ansatz für 3 min bei 13000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Für eine Hochsalzextraktion werden die Rohnuclei (Pellet) in 100 µl kaltem Puffer C (20 mM HEPES/KOH, pH 7.9; 1.5 mM MgCl_2 ; 0.2 mM EDTA; 25 % Glycerol; 420 mM NaCl; 0.5 mM DTT; 0.2 mM PMSF; inkl. Proteaseinhibitormix) durch mehrmaliges auf- und abpipettieren resuspendiert und 20-30 min auf Eis gestellt. Nach einer finalen Zentrifugation für 5 min bei 13000 UpM und 4 °C wird der Überstand (Kernextrakt) zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -70 °C gelagert

4.11.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur qualitativen und quantitativen Verifizierung der transient in eukaryontischen Zellen exprimierten Proteine, anhand von immunologischen Western-Blot-Analysen, werden Gesamtzellextrakte wie folgt hergestellt:

1×10^7 Zellen werden in 1 ml 4 x Probenpuffer (1:1 in H_2O verdünnter 8 x Probenpuffer; s. 4.8.2.1) aufgenommen, 30 sec gevortext und 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend können die Proben bei -20 °C gelagert werden.

4.11.3 Dialyse

Zum Austausch von Puffersubstanzen oder Entfernen von Salzen werden Proteinlösungen bei 4 °C über Nacht gegen das 200-fache Volumen der neuen Pufferlösung dialysiert. Bei großen Volumina (> 15 ml) wird ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze (MWCO) von 3500 Da verwendet (*Snake-skin Dialysis Membrane*, Pierce). Kleine Volumina werden mittels Kollodiumhülsen (Satorius), wie oben beschrieben, dialysiert.

4.11.4 Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Methode)

(nach Smith *et al.*, 1985)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der BCA-Methode basiert auf einer Komplexbildung von Proteinen mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen werden dabei zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen photometrisch nachweisbaren, violetten Farbkomplex bilden.

Die Gebrauchslösung für eine Mikrotiterplatte für optische Tests setzt sich dabei folgendermaßen zusammen (15 ml A plus 0.3 ml B):

Lösung A	1 g BCA; 2 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$; 0.16 g Na_2 -Tartrat; 0.95 g NaHCO_3 ; 10 ml 1 N NaOH auf pH 11.25 einstellen und mit H_2O auf 100 ml auffüllen.
Lösung B	4 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ mit H_2O auf 100 ml auffüllen.

Für die Reaktion werden zunächst 100 µl Gebrauchslösung in die Reihen B-H der Mikrotiterplatte vorgelegt. Nun werden je 10 µl der zu messenden Proben in die *wells* der Reihe A pipettiert, anschließend zeitgleich mit 190 µl Gebrauchslösung überschichtet und sofort in 100 µl Schritten von Reihe zu Reihe 1:1 verdünnt. Nach einer Inkubation von 30-60 min bei 65 °C folgt die photometrische Messung bei $\lambda = 570$ nm (genauer wären 562 nm).

4.11.5 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Die Luciferaseaktivität kann als Maß der Expression des Luciferase-Gens angesehen werden. Aus diesem Grund ist das Luciferasesystem als Reportergen für Promotorstudien bestens geeignet.

Stabile Klongemische verschiedenster Reportergenkontstrukture in murinen LM(Tk⁻)-Zellen (s. 4.10.2.7) werden für Virusinduktionsstudien stabiler Klongemische (s. 4.10.2.8.1) bzw. nach transienter Expression (s. 4.10.2.8.2) in entsprechenden Zellzahlen auf 6-well Platten ausgesät. Etwa 24 h nach der Virusinduktion werden die Zellen für den Luciferaseaktivitätstest (*luciferase assay system*, Promega) geerntet. Dazu werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, danach mit 500 µl *passive lysis buffer* (PLB) überschichtet und 15 min bei RT auf einer Wippe geschwenkt. Anschließend werden die Lysate in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt, 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert und die Überstände in frische 1.5 ml Reaktionsgefäße dekantiert. Die Messung am Luminometer (Lumat LB 9501 und LB 9507, Fa. Berthold) wird wie folgt durchgeführt: Das Gerät wird zunächst mit der Substratlösung befüllt. Für die eigentliche Messung werden 10 µl Lysat an den Boden eines Luminometerröhrchens vorgelegt, das Röhrchen in das Luminometer gestellt und auf Tastendruck 100 µl Luciferinreaktionsmix direkt auf das Lysat injiziert.

Für eine anschließende Proteinbestimmung (s. 4.11.4) können die Lysate, zusammen mit einem Aliquot PLB, bei -20 °C eingefroren werden.

4.11.6 Western Blotting

Beim Western-Blot erfolgt ein Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben auf eine Nitrocellulose-Membran, um sie dort immunologisch identifizieren zu können (nach Towbin *et al.*, 1979).

Nach der Elektrophorese wird das Gel für etwa 5 min in Blotpuffer (25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycin; 15 % Methanol (v/v)) äquilibriert. Währenddessen werden 3 Whatmann-3MM-Filterpapiere (8.5 cm x 6.5 cm) und eine Hybond-ECL-Nitrocellulose-Membran (Firma, Amersham) derselben Größe nacheinander in Blotpuffer geschwenkt. Anschließend werden die Bestandteile in der Reihenfolge 3 x Whatmann, Membran und Gel aufeinander gelegt und final mit weiteren drei Lagen Blotpuffer-getränktem Whatmann-Papier bedeckt. Dieses *sandwich* wird auf die *semi-dry* Elektroblot-Apparatur überführt, mithilfe einer Glaspipette von Luftblasen befreit und zuletzt mit Blotpuffer „überschichtet“. Der Transfer der Proteine erfolgt 30 min bei einer konstanten Spannung von 10 V.

Für den immunologischen Nachweis der transferierten Proteine werden die freien Bindungsplätze der Nitrocellulose-Membran zunächst mit 5 % Milchpulver (MP) in TBS-T (20

mM Tris/HCl, pH 7.5; 137 mM NaCl; 0.05 % Tween-20) abgesättigt (90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C). Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung in 3 % MP/TBS-T) und anschließend dem entsprechenden peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnung ebenfalls in 3 % MP/TBS-T) erfolgt für je 1 h bei RT. Zwischen allen Inkubationsschritten wird die Membran dreimal schnell und dreimal 5 min in TBS-T gewaschen.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden mithilfe der *enhanced chemiluminescence* (*Western Blotting Luminol Reagent*, SantaCruz), nach Herstellerangaben, nachgewiesen.

4.11.7 DNA-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung und anschließender Charakterisierung von DNA-bindenden Proteinen gibt es eine Vielzahl an affinitätschromatographischen Methoden. Im Folgenden wird neben der unspezifischen Heparinsäulenfraktionierung die Oligonukleotid-vermittelte un-/spezifische DNA-Affinitätschromatographie, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, näher beschrieben.

4.11.7.1 Heparinsäulenfraktionierung

Das Prinzip dieser Methode basiert auf den chemischen Eigenschaften und der strukturellen Beschaffenheit von Heparin. Heparin ist ein DNA-Analogon und kann, kovalent an Sepharose gekoppelt, als Affinitätsmatrix zur fraktionierten Reinigung von DNA-bindenden Proteinen aus Kernextrakten verwendet werden. Hierbei werden Kernextraktproteine mittels FPLC-Technik (*Fast Performance Liquid Chromatography*, Äkta von Amersham) über eine Heparinsäule und entsprechendem Salzgradienten nach ihrer Affinität für Heparin voneinander getrennt.

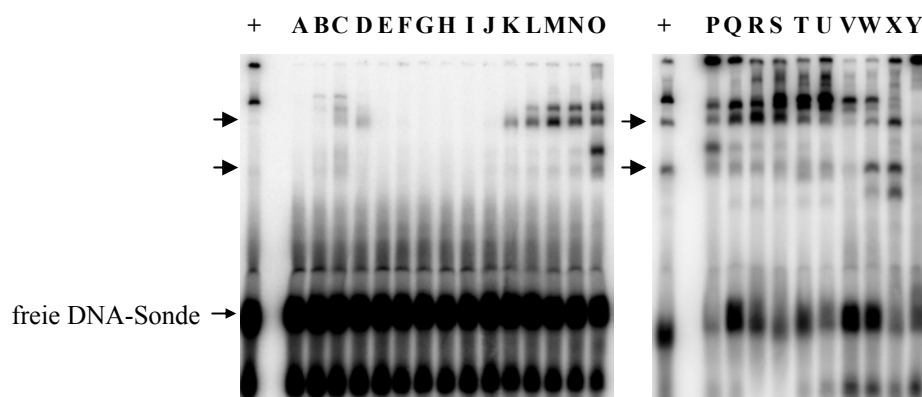


Abb. 4.1 EMSA-Autoradiogramm verschiedener Heparinsäulenfraktionen

Die Abbildung zeigt Protein-DNA Komplexe einer Reihe von Heparinsäulenfraktionen (A-Y) in Gegenwart einer doppelsträngigen DNA-Sonde. Dicke schwarze Pfeile markieren die Positionen spezifischer *shifts* der Positivkontrolle (+).

Für die Fraktionierung wird eine 1 ml HiTrap Heparin HP Säule (Fa. Amersham) zunächst mit Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris, pH 7.5) äquilibriert. Anschließend wird der Kernextrakt [2-4 mg/ml] auf die Säule gegeben, ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit Niedrigsalzpuffer entfernt und die Fraktionierung gestartet. Zur Trennung des Proteingemisches wird ein Gradient von 0-1 M NaCl mit einem Elutionsvolumen von 25 ml (entspricht 25-fachem Säulenvolumen) gefahren. Die Fraktionsgröße beträgt 0.2 ml bei einer Flussrate von 0.2 ml/min. Die Verifizierung der Fraktionen (Fraktionspools à 5 Einzelfraktionen) erfolgt mittels EMSA-Analysen (s. 4.9.3) unter Verwendung geeigneter DNA-Sonden. In Abbildung 4.1 ist ein charakteristisches EMSA-Profil gezeigt.

4.11.7.2 Oligonukleotid-vermittelte DNA-Affinitätschromatographie

Bei der Oligonukleotid-vermittelten DNA-Affinitätschromatographie handelt es um eine elegante Methode zur Isolierung spezifisch DNA-bindender Proteine. Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA wird an eine stationäre Matrix gekoppelt und mit Kernextraktproteinen inkubiert. DNA-bindende Proteine, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen, interagieren mit den Nukleinsäuren und können nach mehreren Waschschritten mittels Detergenzien (Triton-X-100), pH-Sprung oder Hochsalzlösung (KCl, NaCl, Urea, etc.) eluiert werden. Zur weiteren Charakterisierung können massenspektrometrische Methoden wie MALDI-TOF und/oder ESI/Q-TOF hinzugezogen werden.

5. Abkürzungen & Zeichen

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A	Adenosin
aa	Aminosäure
α	alpha
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
amp ^r	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	<i>counts per minute</i>
d	Durchmesser
δ	delta
Da	Dalton
DB	<i>dilution buffer</i>
DHGP	Deutsches Humanes Genomprojekt
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N steht für Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin)
DOS	<i>drop out solution</i>
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ϵ	epsilon
EB	<i>elution buffer</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
et al.	<i>et altera</i> , und andere
etc.	<i>et cetera</i> , und weitere
evtl.	eventuell
F	Farad
Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum
fmol	Femtomol
fw	<i>forward strand</i>
g	Gramm
G	Guanin

γ	gamma
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIS	Histidin
HMW(-DNA)	<i>high molecular weight</i> DNA
HS	Desoxyribonuklease I hypersensitive Stelle
hu	human
IFN	Interferon
ILG	Interferon-beta Promotorelement, Luciferase-GFP-Fusionsgen
inkl.	inklusive
κ	kappa
kb	Kilobasen
KE	Kernextrakt
kg	Kilogramm
l	Liter
λ	lambda
LacZ	β -Galactosidase
LCR	<i>locus control region</i>
LEU	Leucin
M	molar
μ	mikro
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mol	Mol
mM	millimolar
MP	Milchpulver
MQ-Wasser	Milli Q-Wasser (hochreines, deionisiertes Wasser)
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
msE	<i>murine short</i> EMSA (Oligonukleotidbezeichnung)
mu	murin
Mut/mut	Mutation
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NDV	<i>newcastle disease virus</i>
neo	Neomycinphosphotransferase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP40	Nonident P40
Ω	Ohm
ω	omega
OD	optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i>
p	Plasmid
P	Promotor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PUR	Purin-reich

re	<i>reverse strand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S/MAR	<i>scaffold/matrix attachment region</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sE	<i>short</i> EMSA (Oligonukleotidbezeichnung)
sec	Sekunde
SIDD	<i>stress-induced duplex destabilization</i>
s.o.	siehe oben
spez.	spezifisch
ss	einzelsträngig
SV40	Simian Virus 40
T	Terminator
T	Thymidin
τ	tau
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TC	<i>tissue culture</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TEP	Trypsin-EDTA in PBS
Tk	Thymidin-Kinase
TNE	Tris-NaCl-EDTA-Puffer
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	<i>units</i> , Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
URA	Uracil
UV	ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
vgl.	vergleiche
VRE	<i>virus response element</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
WB	<i>washing buffer</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl - β -D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

6. Literaturverzeichnis

- AGALIOTI T., CHEN G., THANOS D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene; *Cell* 111: 381-392
- AGALIOTI T., LOMVARDAS S., PAREKH B., YIE J., MANIATIS T., THANOS D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- β promoter; *Cell* 103: 667-678
- ALBERTS B. M., AMODIO F. J., JENKINS M., GUTMAN E. D., FERRIS F. J. (1968). Studies with DNA-cellulose chromatography. I. DNA-binding proteins from *Escherichia coli*; *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33: 289-305
- ALMER A., RUDOLPH H., HINNEN A., HORZ W. (1986). Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional activating DNA elements; *EMBO J.* 5(10): 2689-2696
- ANDREWS N. C., FALLER D.V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells; *Nucleic Acids Res.* 19(9): 2499
- ARNDT-JOVIN D. J., JOVIN T. M., BAHR W., FRISCHAUF A. M., MARQUARDT M. (1975). Covalent attachment of DNA to agarose. Improved synthesis and use in affinity chromatography; *Eur. J. Biochem.* 54(2): 411-418
- ATCHISON M. L. (1988). Enhancers: mechanisms of action and cell specificity; *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 127-153
- AUSTEN M., LUSCHER B., LUSCHER-FIRZLAFF J. M., (1997). Characterization of the transcriptional regulator YY1. The bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP-responsive element-binding protein (CBP)-binding protein; *J. Biol. Chem.* 272(3): 1709-1717
- AUSTEN M., CERNI C., LUSCHER-FIRZLAFF J. M., LUSCHER B. (1998). YY1 can inhibit c-Myc function through a mechanism requiring DNA binding of YY1 but neither its transactivation interaction with c-Myc; *Oncogene* 17(4): 511-520
- BABB R., CLEARY M. A., HERR W. (1997). OCA-B is a functional analog of VP16 but targets a separate surface of the Oct-1 POU domain; *Mol. Cell. Biol.* 18(4): 2430
- BAER A., SCHUEBELER D., BODE J. (2000). Transcriptional properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection; *Biochemistry* 39(24): 7041-7049
- BARTEL P. L., CHIEN C.-T., STERNGLANZ R., FIELDS S. (1993). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions; *Oxford University Press*, Oxford; 153-179
- BASU A., PARK K., ATCHISON M. L., CARTER R. S., AVADHANI N. G. (1993). Identification of a transcriptional initiator element in the cytochrome c oxidase subunit Vb

promoter which binds to transcription factors NF-E1 (YY-1, delta) and Sp1; *J. Biol. Chem.* 268(6): 4188-4196

BAUKNECHT T., SEE R. H., SHI Y. (1996). A novel C/EBP beta-YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region; *J. Virol.* 70(11): 7695-7705

BAUMRUKER T., STURM R., HERR W. (1988). OBP100 binds remarkably degenerate octamer motifs through specific interactions with flanking sequences; *Genes Dev.* 2(11): 1400-1413

BENHAM C. J. (1993). Sites of predicted stress-induced DNA duplex destabilization occur preferentially at regulatory loci; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(7): 2999-3003

BENHAM C. J. (1996). Duplex destabilization in superhelical DNA is predicted to occur at specific transcriptional regulatory regions; *J. Mol. Biol.* 255: 425-434

BENHAM C., KOHWI-SHIGEMATSU T., BODE J. (1997). Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions; *J. Mol. Biol.* 274(2): 181-196

BERGEMANN A. D., JOHNSON E. M. (1992). The HeLa pur factor binds single-stranded DNA at a specific element conserved in gene flanking regions and origins of replication; *Mol. Cell. Biol.* 12(3): 1257-1265

BERGEMANN A. D., MA Z.-W., JOHNSON E. M. (1992). Sequence of cDNA comprising the human *pur* gene and sequence-specific single-stranded DNA-binding properties of the encoded protein; *Mol. Cell. Biol.* 12(12): 5673-5682

BIDWELL J. P., VAN WIJNEN A. J., FEY E. G., DWORETZKY S. I., PENMAN S., STEIN J. L., LIAN J. B., STEIN G. S. (1993). Osteocalcin gene promoter-binding factors are tissue-specific nuclear matrix components; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(8): 3162-3166

BODE J., BENHAM C., ERNST E., KNOPP A., MARSCHALEK R., STRICK R., STRISSEL P. (2000b). Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix; *J. Cell. Biochem. Suppl.* 35: 3-22

BODE J., BENHAM C., KNOPP A., MIELKE C. (2000a). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by Scaffold/Matrix-Attached Regions; *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 10(1): 73-90

BODE J., HAUSER H. (1990). Biologische Wirkung von Interferonen und Induktionsmechanismen der Interferone; Carl Hanser Verlag, Munich: 57-93

BODE J., PUCHER H. J., MAASS K. (1986). Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon-beta genes in a mouse host cell; *Eur. J. Biochem.* 158(2): 393-401

BRIGGS M. R., KADONAGA J. T., BELL S. P., TIJAN R. (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1; *Science* 234(4772): 47-52

- BROWN J. L., MUCCI D., WHITELEY M., DIRKSEN M. L., KASSIS J. A. (1998). The *Drosophila* polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1; *Mol. Cell* 1(7): 1057-1064
- BULLOCK W. O. (1987). *Biotechniques* 5: 376-378
- BURCH J. B. E., WEINTRAUB H. (1983). Temporal order of chromatin structural changes associated with activation of the major chicken vitellogenin gene; *Cell* 33(1): 65-76
- BUSHMEYER S., PARK K., ATCHISON M. L. (1995). Characterization of functional domains within the multifunctional transcription factor, YY1; *J. Biol. Chem.* 270(50): 30213-30220
- BUSHMEYER S. M., ATCHISON M. L. (1998). Identification of YY1 sequences necessary for association with the nuclear matrix and for transcriptional repression functions; *J. Cell. Biochem.* 68(4): 484-499
- CAREY M. (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy; *Cell* 92(1): 5-8
- CEPEK K. L., CHASMAN D. I., SHARP P. A. (1996). Sequence-specific DNA binding of the B-cell-specific coactivator OCA-B; *Genes Dev.* 10(16): 2079-2088
- CHANDARAN U. R., ATTARDIS B., FRIEDMAN R., ZHENG Z.-W., ROBERTS J. L., DeFRANCO D. B. (1996). Glucocorticoid repression of the mouse gonadotropin-releasing hormone gene is mediated by promoter elements that are recognized by heterodimeric complexes containing glucocorticoid receptor; *J. Biol. Chem.* 271(34): 20412-20420
- CHANDARAN U. R., WARREN B. S., BAUMANN C. T., HAGER G. L., DeFRANCO D. B. (1999). The glucocorticoid receptor is tethered to DNA-bound Oct-1 at the mouse gonadotropin-releasing hormone distal negative glucocorticoid response element; *J. Biol. Chem.* 274(4): 2372-2378
- CHANG C. F., GALLIA G. L., MURALIDHARAN V., CHEN N. N., ZOLTICK P., JOHNSON E., KHALILI K. (1996). Evidence that replication of human neurotropic JC virus DNA in glial cells is regulated by the sequence-specific single-stranded DNA-binding protein Pur α ; *J. Virol.* 70(6): 4150-4156
- CHEN N. N., CHANG C.-F., GALLIA G. L., KERR D. A., JOHNSON E. M., KRACHMAROV C. P., BARR S. M., FRISQUE R. J., BOLLAG B., KHALILI K. (1995). Cooperative action of cellular proteins YB-1 and Pur α with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the viral lytic control element; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(4): 1087-1091
- CHEN N. N., KHALILI K. (1995). Transcriptional regulation of human JC polyomavirus promoters by cellular proteins YB-1 and Pur α in glial cells; *J. Virol.* 69(9): 5843-5848
- CHEPENIK L.G., TRETIAKOVA A. P., KRACHMAROV C. P., JOHNSON E. M., KHALILI K. (1998). The single-stranded DNA binding protein, Pur- α , binds HIV-1 TAR RNA and activates HIV-1 transcription; *Gene* 210(1): 37-44

- CHIANG C. M., ROEDER R. G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators; *Science* 267(5197): 531-536
- CHUNG J. H., WHITELEY M., FELSENFELD G. (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*; *Cell* 74(3): 505-514
- COCKERILL P. N., GARRARD W. T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites; *Cell* 44: 273-282
- DARBINIAN N., GALLIA G. L., KUNDU M., SHCHERBIK N., TRETIKOVA A., GIORDANO A., KHALILI K. (1999). Association of Pura α and E2F-1 suppresses transcriptional activity of E2F-1; *Oncogene* 18(46): 6398-6402
- DAVIE J. R., CHADEE D. N. (1998). Regulation and regulatory parameters of histone modifications; *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30-31: 203-213
- DIAZ M. O., POMYKALA H. M., BOHLANDER S. K., MALTEPE E., MALIK K., BROWNSTEIN B., OLOPADE O. I. (1994). Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig; *Genomics* 22(3): 540-552
- DIGNAM J. D., LEOVITZ R. M., ROEDER R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei; *Nucleic Acids Res.* 11: 1475-1489
- DINTER H., HAUSER H. (1987). Cooperative interaction of multiple DNA elements in the human interferon-beta promoter; *Eur. J. Biochem.* 166(1): 103-109
- DONOHUE M. E., ZHANG X., MCGINNIS L., BIGGERS J., LI E., SHI Y. (1999). Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality; *Mol. Cell. Biol.* 19(10): 7237-7244
- DU Q., TOMKINSON A. E., GARDNER P. D. (1997). Transcriptional regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes. A possible role for the DNA-binding protein Pura α ; *J. Biol. Chem.* 272(23): 14990-14995
- DWORETZKY S. I., WRIGHT K. L., FEY E. G., PENMAN S., LIAN J. B., STEIN J. L., STEIN G. S. (1992). Sequence-specific DNA-binding proteins are components of a nuclear matrix-attachment site; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 4178-4182
- EISSENBERG J. C., CARTWRIGHT I. L., THOMAS G. H., ELGIN S. C. R. (1985). Selected topics in chromatin structure; *Ann. Rev. Genet.* 19: 485-536
- ELGIN S. C. R. (1981). DNAase I-hypersensitive sites of chromatin; *Cell* 27(3 Pt 2): 413-415
- ERNST E. (2000). Lokalisierung und Analyse DNase I-hypersensitiver Schnittstellen im menschlichen Typ I Interferon-Gencluster. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.

- FAN C., MANIATIS T. (1989). Two different virus-inducible elements are required for human β -interferon gene regulation; *EMBO J.* 8: 101-110
- FLANAGAN J. R., BECKER K. G., ENNIST D. L., GLEASON S. L., DRIGGERS P. H., LEVI B. Z., APPELLA E., OZATA K. (1992). Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of moloney murine leukemia virus; *Mol. Cell. Biol.* 12(1): 38-44
- FLETCHER C., HEINTZ N., ROEDER R. G. (1987). Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulates cell cycle expression of a human histone H2B gene; *Cell* 51(5): 773-781
- FORRESTER W. C., TAKEGAWA S., PAPAYANNOPOULOU T., STAMATOYANNOPOULOS G., GROUDINE M. (1987). Evidence for a locus activation region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids; *Nucleic Acids Res.* 15(24): 10159-10177
- FRITTON H. P., IGO-KEMENES T., NOWOCK J., STRECH-JURK U., THEISEN M., SIPPEL A. E. (1984). Alternative sets of DNase I-hypersensitive sites characterize the various functional states of the chicken lysozyme gene; *Nature* 311(5982): 163-165
- FUJITA T., UHNO S., YASUMITSU H., TANIGUCHI T. (1985). Delimitation and properties of DNA sequences required for the regulated expression of human interferon-beta gene; *Cell* 41(2): 489-496
- GABRIELSEN O. S., HORNES E., KORSNES L., RUET A., ØYEN T. B. (1989). Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor τ - a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor; *Nucleic Acids Res.* 17(15): 6253-6267
- GADGIL H., OAK S. A., JARRETT H. W. (2001). Affinity purification of DNA-binding proteins; *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 607-624
- GADGIL H., JARRETT H. W. (1999). Heparin elution of transcription factors from DNA-Sepharose columns; *J. Chromatogr. A.* 848(1-2): 131-138
- GALLIA G. L., DARBINIAN N., JOHNSON E. M., KHALILI K. (1999a). Self-association of Pura is mediated by RNA; *J. Cell. Biochem.* 74(3): 334-348
- GALLIA G. L., DARBINIAN N., TRETIKOVA A., ANSARI S. A., RAPPAPORT J., BRADY J., WORTMAN M. J., JOHNSON E. M., KHALILI K. (1999b). Association of HIV-1 Tat with the cellular protein, Pura, is mediated by RNA; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(20): 11572-11577
- GALLIA G. L., SAFAK M., KHALILI K. (1998). Interaction of the single-stranded DNA-binding protein Pura with the human polyomavirus JC virus early protein T-antigen; *J. Biol. Chem.* 273(49): 32662-32669
- GALLIA G. L., JOHNSON E. M., KHALILI K. (2000). Pura: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein; *Nucleic Acids Res.* 28(17): 3197-3205

- GALVIN K. M., SHI Y. (1997). Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1; *Mol. Cell. Biol.* 17(7): 3723-3732
- GILHAM P. T. (1964). The synthesis of polynucleotide celluloses and their use in the fractionation of polynucleotides; *J. Am. Chem. Soc.* 68: 4982-4985
- GILHAM P. T. (1974). Immobilized polynucleotides and nucleic acids; *Adv. Exp. Med. Biol.* 42(0): 173-185
- GOODBOURN S., BURSTEIN H., MANIATIS T. (1986). The human beta-interferon gene enhancer is under negative control; *Cell* 45(4): 601-610
- GOODBOURN S., MANIATIS T. (1988). Overlapping positive and negative regulatory elements domains of the human β -interferon gene; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(5): 1447-1451
- GOODBOURN S., ZINN K., MANIATIS T. (1985). Human beta-interferon gene expression is regulated by an inducible enhancer element; *Cell* 41(2): 509-520
- GORDON S. J., SALEQUE S., BIRSHTEN B. K. (2003). Yin Yang 1 is a lipopolysaccharide-inducible activator of the murine 3' *Igh* enhancer, hs3; *J. Immunol.* 170: 5549-5557
- GROSS D. S., GARRARD W. T. (1987). Poising chromatin for transcription; *Trend Biochem. Sci.* 12: 293-297
- GROSS D. S., GARRARD W. T. (1988). Nuclease hypersensitive sites in chromatin; *Ann. Rev. Biochem.* 57: 159-197
- GROUDINE M., KOHWI-SHIGEMATSU T., GELINAS R., STAMATOYANNOPOULOS G., PAPAYANNOPOULOU T. (1983). Human fetal to adult hemoglobin switching: changes in chromatin structure of the beta-globin gene locus; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(24): 7551-7555
- GSTAIGER M., GEORGIEV O., VAN LEEUWEN H., VAN DER VLIET P. C. (1996). The B cell coactivator Bob1 shows DNA sequence-dependent complex formation with Oct-1/Oct-2 factors, leading to differential promoter activation; *EMBO J.* 15(11): 2781-2790
- GUALBERTO A., LePAGE D., PONS G., MADER S. L., PARK K., ATCHISON M. L., WALSH K. (1992). Functional antagonism between YY1 and the serum response factor; *Mol. Cell. Biol.* 12(9): 4209-4214
- GUO B., ODGREN P. R., VAN WIJNEN A. J., LAST T. J., NICKERSON J., PENMAN S., LIAN J. B., STEIN J. L., STEIN G. S. (1995). The nuclear matrix protein NMP-1 is the transcription factor YY1; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 10526-10530
- GUPTA M., SUEBLINVONG V., RAMAN J., JEEVANANDAM V., GUPTA M. P. (2003). Single-stranded DNA-binding proteins PUR α and PUR β bind to a purine-rich negative regulatory element of the α -myosin heavy chain gene and control transcriptional and translational regulation of the gene expression. Implications in the repression of α -myosin heavy chain during heart failure; *J. Biol. Chem.* 278(45): 44935-44948

- HAAS S., GORDON J., KHALILI K. (1993). A developmentally regulated DNA-binding protein from mouse brain stimulates myelin basic protein gene expression; *Mol. Cell. Biol.* 13(5): 3103-3112
- HAAS S., STEPLEWSKI A., SIRACUSA L. D., AMINI S., KHALILI K. (1995a). Identification of a sequence-specific single-stranded DNA binding protein that suppresses transcription of the mouse myelin basic protein gene; *J. Biol. Chem.* 270(21): 12503-12510
- HAAS S., THATIKUNTA P., STEPLEWSKI A., JOHNSON E. M., KHALILI K., AMINI S. (1995b). A 39-kDa DNA-binding protein from mouse brain stimulates transcription of myelin basic protein gene in oligodendrocytes; *J. Cell Biol.* 130(5): 1171-1179
- HAGEN G., MULLER S., BEATO M., SUSKE G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes; *Nucleic Acids Res.* 20(21): 5519-5525
- HAGEN G., MULLER S., BEATO M., SUSKE G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3; *EMBO J.* 13(16): 3843-3851
- HAGEN G., DENNIG J., PREISS A., BEATO M., SUSKE G. (1995). Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3; *J. Biol. Chem.* 270(42): 24989-24994
- HARADA H., FUJITA T., MIYAMOTO M., KIMURA Y., MARUYAMA M., FURIA A., MIYATA T., TANIGUCHI T. (1989). Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes; *Cell* 58(4): 729-739
- HARIHARAN N., KELLEY D. E., PERRY R. P. (1991). δ , a transcription factor that binds to downstream elements in several polymerase II promoters, is a functionally versatile zinc finger protein; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(21): 9799-9803
- HART G. W. (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins; *Annu. Rev. Biochem.* 66: 315-335
- HAUSER H., GROSS G., BRUNS W., HOCHKEPPEL H., MAYR U., COLLINS J. (1982). Inducibility of human β -interferon gene in mouse L-cell clones; *Nature* 297: 650-654
- HE L., LIU J., COLLINS I., SANFORD S., O'CONNELL B., BENHAM C. J., LEVENS D. (2000). Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression; *EMBO J.* 19(5): 1034-1044
- HE X., TREACY M. N., SIMMONS D. M., INGRAHAM H. A., SWANSON L. W., ROSENFELD M. G. (1989). Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development; *Nature* 340(6228): 35-42
- HENCO K., BROSIUS J., FUJISAWA A., FUJISAWA J. I., HAYNES J. R., HOCHSTADT J., KOVACIC T., PASEK M., SCHAMBOCK A., SCHMID J., ET A. L. (1985). Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes; *J. Mol. Biol.* 185(2): 227-260

- HERAULT Y., CHATELAIN G., BRUM G., MICHEL D. (1995). RNA-dependent DNA binding activity of the Pur factor, potentially involved in DNA replication and gene transcription; *Gene Expr.* 4(3): 85-93
- HINKLEY C., PERRY M. (1992). Histone H2B gene-transcription during *Xenopus* early development requires functional co-operation between proteins bound to the CCAAT and octamer motifs; *Mol. Cell. Biol.* 12(10): 4400-4411
- HIROMURA M., CHOI C. H., SABOURIN N. A., JONES H., BACHVAROV D., USHEVA A. (2003). YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation); *J. Biol. Chem.* 278(16): 14046-14052
- HOLMES D. S., QUIGLEY M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids; *Anal Biochem.* 114(1):193-7
- HONGMEI Y., MA G., LIN C. H., ORR M., WATHELET M. G. (2004). Mechanism for transcriptional synergy between interferon regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in activation of the interferon- β gene promoter; *Eur. J. Biochem.* 271: 3693-3703
- HUANG N. E., LIN C.-H., LIN Y.-S., W. C. Y. YU (2003). Modulation of YY1 activity by SAP30; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 267-275
- HUNTER T., KARIN M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation; *Cell* 70(3): 375-387
- HYDE-DeRUYSCHER R. P., JENNINGS E., SHENK T. (1995). DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1; *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4457-4465
- IMAI S., NISHIBAYASHI S., TAKAO K., TOMIFUJI M., FUJINO T., HASEGAWA M., TAKANO T. (1997). Dissociation of Oct-1 from the nuclear peripheral structure induces the cellular aging-associated collagenase gene expression; *Mol. Biol. Cell.* 8(12): 2407-2419
- IMHOF A., WOLFFE A. P. (1998). Transcription: gene control by targeted histone acetylation; *Curr. Biol.* 8(12): R422-424.
- INOUE C. J., SETO E. (1994). Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23; *J. Biol. Chem.* 269(9): 6506-6510
- ISAACS A., LINDENMANN J. (1987). Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957; *J. Interferon Res.* 7(5): 429-438
- JANSON L., WELLER P., PETTERSON U. (1989). Nuclear factor I can functionally replace transcription factor Sp1 in a U2 small nuclear RNA gene enhancer; *J. Mol. Biol.* 205(2): 387-396
- JOHNSON E. M., CHEN P.-L., KRACHMAROV C. P., BARR S. M., KANOVSKY M., MA Z.-W., LEE W.-H. (1995). Association of human Pur α with the retinoblastoma protein, Rb, regulates binding to the single-stranded DNA Pur α recognition element; *J. Biol. Chem.* 270(41): 24352-24360

- JURK M., WEISSINGER F., LOTTSPREICH F., SCHWARZ U., WINNACKER E. L. (1996). Characterization of the single-strand-specific BPV-1 origin binding protein, SPSF I, as HeLa Pur α factor; *Nucleic Acids Res.* 24(14): 2799-2806
- KAKKIS E., CALAME K. (1987). A plasmacytoma-specific factor binds the c-myc promoter region; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(20): 7031-7035
- KALENIK J. L., CHEN D., BRADLEY M. E., CHEN S.-J., LEE T.-C. (1997). Yeast two-hybrid cloning of a novel zinc finger protein that interacts with the multifunctional transcription factor YY1; *Nucleic Acids Res.* 25(4): 843-849
- KELLER A. D., MANIATIS T. (1991). Identification and characterization of a novel repressor of β -interferon gene expression; *Genes Dev.* 5: 868-879
- KELM R. J., COGAN J. G., ELDER P. K., STRAUCH A. R., GETZ M. J. (1999a). Molecular interactions between single-stranded DNA-binding proteins associated with all essential MCAT element in the mouse smooth muscle α -actin promoter; *J. Biol. Chem.* 274(20): 14238-14245
- KELM R. J., ELDER P. K., GETZ M. J. (1999b). The single-stranded DNA-binding proteins, Pur α , Pur β , and MSY1 specifically interact with an exon 3-derived mouse vascular smooth muscle α -actin messenger RNA sequence; *J. Biol. Chem.* 274(53): 38268-38275
- KELM R. J., ELDER P. K., STRAUCH A. R., GETZ M. J. (1997). Sequence of cDNAs encoding components of vascular actin single-stranded DNA-binding factor 2 establish identity to Pur α and Pur β ; *J. Biol. Chem.* 272(42): 26727-26733
- KELM R. J., SUN S., STRAUCH A. R., GETZ M. J. (1996). Repression of transcriptional enhancer factor-1 and activator protein-1-dependent enhancer activity by vascular actin single-stranded DNA binding factor 2; *J. Biol. Chem.* 271(39): 24278-24285
- KIM T. K., KIM T. H., MANIATIS T. (1998). Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA polymerase II holoenzyme by an interferon-beta enhanceosome in vitro; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(21): 12191-12196
- KIM J., KOLLHOFF A., BERGMANN A., STUBBS L. (2003). Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, *Peg3*; *Human Mol. Genetics* 12(3): 233-245
- KIM J., SHAPIRO D. J. (1996). In simple synthetic promoters YY1-induced DNA bending is important in transcription activation and repression; *Nucleic Acids Res.* 24(21): 4341-4348
- KIM M. K., LESOON-WOOD L. A., WEINTRAUB B. D., CHUNG J. H. (1996). A soluble transcription factor, Oct-1, is also found in the insoluble nuclear matrix and possesses silencing activity in its alanine-rich domain; *Mol. Cell. Biol.* 16(8): 4366-4377
- KINGSLEY C., WINOTO A. (1992). Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression; *Mol. Cell. Biol.* 12(10): 4251-4261

- KIT S., DUBBS D. R., PIEKARSKI L. J., HSU T. C. (1963). Deletion of thymidine kinase activity from L cells resistant to bromodeoxyuridine; *Exp. Cell Res.* 31: 297-312
- KLEHR D. (1991). Untersuchungen zur Steigerung der Transkription durch *cis*-agierende SAR-Elemente in Mammaliazellen; Dissertation; Technische Universität Braunschweig
- KLEHR D., MAASS K., BODE J. (1991). Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters; *Biochemistry* 30: 1264-1270
- KNOPP A. (2000). Studien zur Struktur von S/MARs am Beispiel einer genomischen Domäne aus dem humanen Interferon-Gencluster; Dissertation; Technische Universität Braunschweig
- KOLLIAS G., HURST J., DeBOER E., GROSVELD F. (1987). The human beta-globin gene contains a downstream developmental specific enhancer; *Nucleic Acids Res.* 15(14): 5739-5747
- KREMPEN K., GROTKOPP D., HALL K., BACHE A., GILLAN A., RIPPE R. A., BRENNER D. A., BREINDL M. (1999). Far upstream regulatory elements enhance position-independent and uterus-specific expression of the murine $\alpha 1(I)$ collagen promoter in transgenic mice; *Gene Expr.* 8(3): 151-163
- KUNKELL G. R., PEDERSON T. (1988). Upstream elements required for efficient transcription of human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used; *Genes Dev.* 2(2): 196-204
- KUO C. H., NISHIKAWA E., ICHIKAWA H., SADAKATA T., NIU S. Y., MIKI N. (1999). Calmodulin functions as an activator of Pur α binding to single-stranded purine-rich DNA elements (PUR elements); *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255(2): 406-411
- LAST T. J., VAN WIJNEN A. J., BIRNBAUM M. J., STEIN G. S., STEIN J. L. (1999). Multiple interactions of the transcription factor YY1 with human histone H4 gene regulatory elements; *J. Cell. Biochem.* 72(4): 507-516
- LEBLANC B., BENHAM C. J., CLARK D. J. (2000). An initiation element in the yeast CUP1 promoter is recognized by RNA polymerase II in the absence of TATA box-binding protein if the DNA is negatively supercoiled; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(20): 10745-10750
- LEE J. S., GALVIN K. M., SEE R. H., ECKNER R., LIVINGSTON D., MORAN E., SHI Y. (1995a). Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300; *Genes Dev.* 9(15): 1188-1198
- LEE J. S., GALVIN K. M., SHI Y. (1993). Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13): 6145-6149
- LEE J. S., SEE R. H., GALVIN K. M., WANG J., SHI Y. (1995b). Functional interactions between YY1 and adenovirus E1A; *Nucleic Acids Res.* 23(6): 925-931
- LEE T. C., SHI Y., SCHWARTZ R. J. (1992). Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(20): 9814-9818

- LEE T. C., ZHANG Y., SCHWARTZ R. J. (1994). Bifunctional transcriptional properties of YY1 in regulating muscle actin and c-myc gene expression during myogenesis; *Oncogene* 9(4): 1047-1052
- LEE J. S., ZHANG X., SHI Y. (1996). Differential interactions of the CREB/ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A; *J. Biol. Chem.* 271(30): 17666-17674
- LEFSTIN J. A., JAMAMOTO K. R. (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators; *Nature* 392(6679): 885-888
- LEWIS B. A., TULLIS G., SETO E., HORIKOSHI N., WEINMANN R., SHENK T. (1995). Adenovirus E1A proteins interact with the cellular YY1 transcription factor; *J. Virol.* 69(3): 1628-1636
- LIU L. F., WANG J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(20): 7024-7027
- LIU J., WILSON T. E., MILBRANDT J., JOHNSTON M. (1993). Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system; *Methods Enzymol.* 5: 125-137
- LU S.-Y., RODRIGUEZ M., LIAO W. S.-L. (1994). YY1 represses rat serum amyloid A1 gene transcription and is antagonized by NF- κ B during acute-phase response; *Mol. Cell. Biol.* 14(9): 6253-6263
- MA Z.-W., BERGEMANN A. D., JOHNSON E. M. (1994). Conservation in human and mouse Pura of a motif common to several proteins involved in initiation of DNA replication; *Gene* 149(2): 311-314
- MALONE C. S., PATRONE L., WALL R. (2000a). An essential octamer motif in the mb-1 (Ig alpha) promoter; *Mol. Immunol.* 37(6): 321-328
- MALONE C. S., PATRONE L., BUCHANAN K. L., WEBB C. F., WALL R. (2000b). An upstream Oct-1- and Oct-2-binding silencer governs B29 (Ig beta) gene expression; *J. Immunol.* 164(5): 2550-2556
- MANIATIS T., FALVO J. V., KIM T. H., KIM T. K., LIN C. H., PAREKH B. S., WATHELET M. G. (1998). Structure and function of the interferon- β enhanceosome; *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 63: 609-620
- MANIATIS T., FRITSCH E. F., SAMBROOK J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual; *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY
- MANIATIS T., WHITTEMORE L.-A., DU W., Fan C.-M., KELLER A. D., PALOMBELLA V. J., THANOS D. (1992). Positive and negative control of human interferon- β gene expression; 1193-1220. In McKnight S. L., Yamamoto K. R. (ed.), Transcription regulation; *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY
- McGHEE J. D., WOOD W. I., DOLAN M., ENGEL J. D., FELSENFELD G. (1981). A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult β -globin gene is accessible to nuclease digestion; *Cell* 27(1 Pt 2): 45-55

- McNEIL S., GUO B., STEIN J. L., LIAN J. B., BUSHMEYER S., SETO E., ATCHISON M. L., PENMAN S., VAN WIJNEN A. J., STEIN G. S. (1998). Targeting of the YY1 transcription factor to the nucleolus and the nuclear matrix in situ: the C-terminus is a principal determinant for nuclear trafficking; *J. Cell. Biochem.* 68: 500-510
- MEIER V. S., GRONER B. (1994). The nuclear factor YY1 participates in repression of the β -casein gene promoter in mammary epithelial cells and is counteracted by mammary gland factor during lactogenic hormone induction; *Mol. Cell. Biol.* 14(1): 128-137
- MIELKE C., CHRISTENSEN M. O., WESTERGAARD O., BODE J., BENHAM C. J., BREINDL M. (2002). Multiple collagen 1 gene regulatory elements have sites of stress-induced DNA duplex destabilization and nuclear scaffold/matrix association potential; *J. Cell. Biochem.* 84(3): 484-496
- MIELKE C., KOHWI Y., KOHWI-SHIGEMATSU T., BODE J. (1990). Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: correlation of properties in vitro and function in vivo; *Biochemistry* 29(32): 7475-7485
- MUNSHI N., YIE J., MERIKA M., SENGER K., LOMVARDAS S., AGALITIOTI T., THANOS D. (1999). The IFN- β enhancer: A paradigm for understanding activation and repression of inducible gene expression; *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 64: 149-159
- NATESAN S., GILMAN M. Z. (1993). DNA bending and orientation-dependent function of YY1 in the *c-fos* promoter; *Genes Dev.* 7: 2497-2509
- NGUYEN N., ZHANG X., OLASHAW N., SETO E. (2004). Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2; *J. Biol. Chem.* 279(24): 25927-25934
- NOURBAKHS M., HAUSER H. (1997). The transcriptional silencer protein NRF: A repressor of NF- κ B enhancers; *Immunobiol.* 198(1-3): 65-72
- NOURBAKHS M., HOFFMANN K., HAUSER H. (1993). Interferon- β promoters contain a DNA element that acts as a position-independent silencer on the NF- κ B site; *EMBO J.* 12: 451-459
- O'HARE P., GODING C. R. (1988). Herpes simplex virus regulatory elements and the immunoglobulin octamer domain bind a common factor and are both targets for virion transactivation; *Cell* 52(3): 435-445
- OEI S. L., GRIESENBECK J., SCHWEIGER M., BABICH V., KROPOTOV A., TOMILIN N. (1997). Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240(1): 108-111
- OEI S. L., SHI Y. (2001). Poly(ADP-ribosyl)ation of transcription factor Yin Yang 1 under conditions of DNA damage; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285(1): 27-31
- OSUGI T., DING Y., TANAKA H., KUO C. H., DO E., IRIE Y., MIKI N. (1996). Involvement of a single-stranded DNA binding protein, ssCRE-BP/Pur α , in morphine dependence; *FEBS Lett.* 391(1-2): 11-16

- PARK K., ATCHISON M. L. (1991). Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(21): 9804-9808
- PEDERSON D. S., THOMA F., SIMPSON R. T. (1986). Core particle, fiber, and transcriptionally active chromatin structure; *Ann. Rev. Cell. Biol.* 2: 117-147
- PENNACCHIO L.A., RUBIN E. M. (2001). Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences; *Nat. Rev. Genet.* 2(2): 100-109
- PETKOVA V., ROMANOWSKI M. J., SULJOADIKUSUMO I., ROHNE D., KANG P., SHENK T., USHEVA A. (2001). Interaction between YY1 and the retinoblastoma protein. Regulation of cell cycle progression in differentiated cells; *J. Biol. Chem.* 276(11): 7932-7936
- PHILLIPS K., LUISI B. (2000). The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit; *J. Mol. Biol.* 302(5): 1023-1039
- PRUIJN G. J. M., VAN MILTENBURG R. T., CLAESSENS A. J., VAN DER VLIET P. C. (1988). Interaction between the octamer-binding protein nuclear factor III and the adenovirus origin of DNA replication; *J. Virol.* 62(9): 3092-3102
- RAICH N., CLEGG C. H., GROFTI J., ROMEO P.-H., STAMATOYANNOPOULOS G. (1995). GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene; *EMBO J.* 14(4): 801-809
- RAMIREZ-SOLIS R., DAVIS A. C., BRADLEY A. (1993). Gene targeting in embryonic stem cells; *Methods Enzymol.* 225: 855-878
- RAUGHT B., KHURSHEED B., KAZANSHY A., ROSEN J. (1994). YY1 represses beta-casein gene expression by preventing the formation of a lactation-associated complex; *Mol. Cell. Biol.* 14(3): 1752-1763
- REEVES R. (1984). Transcriptionally active chromatin; *Biochim. Biophys. Acta* 782(4): 343-393
- RIQUET F. B., TAN L., CHOY B. K., OSAKI M., KARSENTY G., OSBORNE T. F., AURON P. E., GOLDRING M. B. (2001). YY1 is a positive regulator of transcription on the *Colla1* gene; *J. Biol. Chem.* 276(42): 38665-38672
- RODER K., SCHWEIZER M. (2001). Running-buffer composition influences DNA-protein and protein-protein complexes detected by electrophoretic mobility-shift assay (EMSA); *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33(Pt 3): 209-214
- ROSENFELD P. J., KELLY T. J. (1986). Purification of nuclear factor I by DNA recognition site affinity chromatography; *J. Biol. Chem.* 261(3): 1398-1408
- ROTHMAN-DENES L. B., DAI X., DAVYDOVA E., CARTER R., KAZMIERCZAK K. (1998). Transcriptional regulation by DNA structural transitions and single-stranded DNA-binding proteins; *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 63: 63-73

- RUPPERT J. M., KINZLER K. W., WONG A. J., BIGNER S. H., KAO F.-T., LAW M. L., SEUANEZ H. N., O'BRIEN S. J., VOGELSTEIN B. (1988). The *GLI*-Kruppel family of human genes; *Mol. Cell. Biol.* 8(8): 3104-3113
- RYAN A. K., ROSENFELD M. G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnership, and developmental codes; *Genes Dev.* 11(10): 1207-1225
- SAFAK M., GALLIA G. L., KHALILI K. (1999). Reciprocal interaction between two cellular proteins, Puro α and YB-1, modulates transcriptional activity of JCVCY in glial cells; *Mol. Cell. Biol.* 19(4): 2712-2723
- SALIMI-TARI P., CHEUNG M., SAFAR C. A., TRACY J. T., TRAN I., HARBERS K., BREINDL M. (1997). Molecular cloning and chromatin structure analysis of the murine $\alpha 1(I)$ collagen gene domain; *Gene* 198(1-2): 61-72
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- SAUTER P., MATTHIAS P. (1998). Coactivator OBF-1 makes selective contacts with both the POU-specific domain and the POU homeodomain and acts as a molecular clamp on DNA; *Mol. Cell. Biol.* 18(12): 7397-7409
- SCOTT W. A., WIGMORE D. J. (1978). Sites in simian virus 40 chromatin which are preferentially cleaved by endonucleases; *Cell* 15(4): 1511-1518
- SETO E., SHI Y., SHENK T. (1991). YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro; *Nature* 354(6350): 241-245
- SETO E., LEWIS B., SHENK T. (1993). Interaction between transcription factors Sp1 and YY1; *Nature* 365: 462-464
- SHERIDAN S. D., BENHAM C. J., HATFIELD G. W. (1998). Activation of gene expression by a novel DNA structural transmission mechanism that requires supercoiling-induced DNA duplex destabilization in an upstream activating sequence; *J. Biol. Chem.* 273(33): 21298-21308
- SHESTAKOVA E., BANDU M. T., DOLY J., BONNEFOY E. (2001). Inhibition of histone deacetylation induces constitutive derepression of the beta interferon promoter and confers antiviral activity; *J. Virol.* 75(7): 3444-3452
- SHI Y., SETO E., CHANG L., SHENK T. (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein and relief of repression by adenovirus E1A protein; *Cell* 67(2): 377-388
- SHI Y., LEE J. S., GALVIN K. M. (1997). Everything you have ever wanted to know about Yin Yang1...; *Biochim. Biophys. Acta* 1332: F49-F66
- SHRIVASTAVA A., CALAME L. (1994). An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1; *Nucleic Acids Res.* 22(24): 5151-5155

- SHRIVASTAVA A., SALEQUE S., KALPANA G. V., ARTANDI S., GOFF S. P., CALAME K. (1993). Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc; *Science* 262(5141): 1889-1892
- SMITH P. K., KROHN R. I., HERMANSON G. T., MALLIA A. K., GARTNER F. H., PROVENZANO M. D., FUJIMOTO E. K., GOEKE N. M., OLSON B. J., KLENK D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid; *Anal. Biochem.* 150: 75-85
- SOUTHERN E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis; *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- STEIN G. S., VAN WIJNEN A. J., STEIN J. L., LIAN J. B., BIDWELL J. P., MONTECINO M. (1994). Nuclear architecture supports integration of physiological regulatory signals for transcription of cell growth and tissue-specific genes during osteoblast differentiation; *J. Cell. Biochem.* 55(1): 4-15
- STELLAMANN E. (2005). Charakterisierung von potentiellen *cis*-regulatorischen Elementen *upstream* des klassischen *virus responsive element* (VRE) am humanen IFN- β Promotor; Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig
- STEPCHENKO A. G. (1992). Interaction of Oct-binding transcription factors with a large series of "noncanonical" oct-sequences: Primary sequence of murine Oct-2B cDNA; *Dokl. Akad. Nauk.* 325(1): 175-179
- STEPCHENKO A. G. (1994). Noncanonical Oct-sequences are targets for mouse Oct-2B transcription factor; *FEBS Lett.* 337(2): 175-178
- STEPCHENKO A. G., LUCHINA N. N., PANKRATOVA E. V. (1997a). Cysteine 50 of the POUh domain determines the range of targets recognized by POU proteins; *Nucleic Acids Res.* 25(14): 2847-2853
- STEPCHENKO A. G., LUCHINA N. N., POLANOVSKY O. L. (1997b). Conservative Val47 residue of POU homeodomain: role in DNA recognition; *FEBS Lett.* 412(1): 5-8
- STERNER D. E., BERGER S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(2): 435-459
- STROM A.-C., FORSBERG M., LILLHAGER P., WESTIN G. (1996). The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression; *Nucleic Acids Res.* 24(11): 1981-1986
- SUN S., STOFLET E. S., COGAN J. G., STRAUCH A. R., GETZ M. J. (1995). Negative regulation of the vascular smooth muscle α -actin gene in fibroblasts and myoblasts: disruption of enhancer function by sequence-specific single-stranded-DNA-binding proteins; *Mol. Cell. Biol.* 15(5): 2429-2436
- SYTINA E. V., PANKRATOVA E. V. (2003). Transcription factor Oct-1: Plasticity and multiplicity of functions; *Mol. Biol.* 37(5): 637-648
- THANOS D., MANIATIS T. (1995a). Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta-interferon gene; *Mol. Cell. Biol.* 15(1): 152-164

- THANOS D., MANIATIS T. (1995b). Virus induction of human IFN β gene expression requires the assembly of an enhanceosome; *Cell* 83(7): 1091-1100
- THOMAS M. J., SETO E. (1999). Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key ?; *Gene* 236: 197-208
- THOMAS G. H., SIEGFRIED E., ELGIN S. C. R. (1985). DNase I hypersensitive sites: a structural feature of chromatin associated with gene expression; In *Chromosomal Proteins and Gene Expression*, (ed.) REECK G., GOODWIN G., PUIGDOMENECH P. NATO ASI Ser. A, 101: 77-101 New York: Plenum
- TJIAN R., MANIATIS T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy peaces; *Cell* 77(1): 5-8
- TOVAR V., DE LA FUENTE M. A., PIZCUETA P., BOSH J., ENGEL P. (2000). Gene structure of the mouse leukocyte cell surface molecule Ly9; *Immunogenetics* 51(10): 788-793
- TOWBIN H., STAEBELIN T., GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(9): 4350-4354
- TRETIKOVA A., GALLIA G. L., SHCHERBIK N., JAMESON B., JOHNSON E. M., AMINI S., KHALILI K. (1998). Association of Pur α with RNAs homologous to 7SL determines its binding ability to the myelin basic protein promoter DNA sequence; *J. Biol. Chem.* 273(35): 22241-22247
- TRETIKOVA A., STEPLEWSKI A., JOHNSON E. M., KHALILI K., AMINI S. (1999). Regulation of myelin basic protein gene transcription by Sp1 and Pur α : evidence for association of Sp1 and Pur α in brain; *J. Cell. Physiol.* 181(1): 160-168
- TSAO Y. P., WU H. Y., LIU L. F. (1989). Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from in vitro studies; *Cell* 56(1): 111-118
- ULLMAN K. S., FLANAGAN W. M., EDWARDS C. A., CRABTREE G. R. (1991). Activation of early gene expression in T lymphocytes by Oct-1 and an inducible protein, OAP; *Science* 254(5031): 558-562
- USHEVA A., SHENK T. (1994). TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA; *Cell* 76(6): 1115-1121
- VAN WIJNEN A. J., BIDWELL J. P., FEY E. G., PENMAN S., LIAN J. B., STEIN J. L., STEIN G. S. (1993). Nuclear matrix association of multiple sequence-specific DNA binding activities related to SP-1, ATF, CCAAT, C/EBP, OCT-1, and AP-1; *Biochemistry* 32: 8397-8402
- VARSHAVSKY A. J., SUNDIN O. H., BOHN M. J. (1978). SV40 viral minichromosome: preferential exposure of the origin of replication as probed by restriction endonucleases; *Nucleic Acids Res.* 5(10): 3469-3479

- VEENSTRA G. J. C., BEUMER Y. L., PETERSON-MADURO J., STEGEMAN B. I., KARG H. A., VAN DER VLIET P. C., DESTREE O. H. J. (1995). Dynamic and differential *Oct-1* expression during early *Xenopus* embryogenesis: persistence of Oct-1 protein following down-regulation of the RNA; *Mech. Devel.* 50(2-3): 103-117
- VEENSTRA G. J. C., PETERSON-MADURO J., MATHU M. T., VAN DER VLIET P. C., DESTREE O. H. J. (1998). Non-cell autonomus induction of apoptosis and loss of posterior structures by activation domain-specific interactions of Oct-1 in the *Xenopus* embryo; *Cell Death Differ.* 5(9): 774-784
- VEENSTRA G. J. C., VAN DER VLIET P. C., DESTREE O. H. J. (1997) POU domain transcription factors in embryonic development; *Mol. Biol. Reports* 24(3): 139-155
- VERRIJZER C. P., ALKEMA M. J., VAN WEPEREN W. W., VAN LEEUWEN H. C., STRATING M. J. J., VAN DER VLIET P. C. (1992). The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains; *EMBO J.* 11(13): 4993-5003
- VERRIJZER C. P., VAN DER VLIET P. C. (1993). POU domain transcription factors; *Biochim. Biophys. Acta* 1173: 1-21
- VINCENT C. K., GUALBERTO A., PATEL C. V., WALSH K. (1993). Different regulatory sequences control creatine kinase-M gene expression in directly injected skeletal and cardiac muscle; *Mol. Cell. Biol.* 13(2): 1264-1272
- VOSSELLER K., SAKABE K., WELLS L., HART G. W. (2002). Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification; *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6(6): 851-857
- WEILL L., SHESTAKOVA E., BONNEFOY E. (2003). Transcription factor YY1 binds to the murine beta interferon promoter and regulates its transcriptional capacity with a dual activator/repressor role; *J. Virol.* 77(5): 2903-2914
- WEINTRAUB H. (1985). Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states; *Cell* 42(3): 705-711
- WHITTEMORE L.-A., MANIATIS T. (1990a). Postinduction turnoff of beta-interferon gene expression; *Mol. Cell. Biol.* 10(4): 1329-1337
- WHITTEMORE L.-A., MANIATIS T. (1990b). Postinduction repression of the beta-interferon gene is mediated through two positive regulatory domains; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(20): 7799-7803
- WILSON T. E., FAHRNER T. J., JOHNSTON M., MILBRANDT J. (1991). Identification of the DNA-binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast; *Science* 252: 1296-1300
- WINGENDER E., CHEN X., HEHL R., KARAS H., LIEBICH I., MATYS V., MEINHARDT T., PRUSS M., REUTER I., SCHACHERER F. (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation; *Nucleic Acids Res.* 28(1): 316-319
- WINGENDER E., DIETZE P., KARAS H., KNUEPPEL R. (1996). TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites; *Nucleic Acids Res.* 24(1): 238-241

- WU C. (1980). The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I; *Nature* 286(5776): 854-860
- WU C., BINHAM P. M., LIVAK K. J., HOLMGREN R., ELGIN S. C. R. (1979). The chromatin structure of specific genes: evidence for higher order domains of defined DNA sequence; *Cell* 16(4): 797-806
- WU C., GILBERT W. (1981). Tissue-specific exposure of chromatin structure at the 5' terminus of the rat prepro insulin II gene; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(3): 1577-1580
- WU C. D., LAI E. J., HUANG N., WEN X. (1997). Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter; *J. Biol. Chem.* 272(4): 2396-2403
- YANG J., MULLERIMMERGLUCK M. M., SCIEPEL K., JANSON L., WESTIN G., SCHAFFNER W., PETTERSON U. (1991). Both Oct-1 and Oct-2a contain domains which can activate the ubiquitously expressed U2 snRNA genes; *EMBO J.* 10(8): 2291-2296
- YANG W. M., INOUE C. J., SETO E. (1995). Cyclophilin A and FKBP12 interact with YY1 and alter its transcriptional activity; *J. Biol. Chem.* 270(25): 15187-15193
- YANG W. M., INOUE C., ZENG Y., BEARSS D., SETO E. (1996). Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(23): 12845-12850
- YANG W. M., YAO Y. L., SUN J. M., DAVIE J. R., SETO E. (1997). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family; *J. Biol. Chem.* 272(44): 28001-28007
- YANIV M., CEREGHINI S. (1986). Structure of transcriptionally active chromatin; *CRC Crit. Rev. Biochem.* 21(1): 1-26
- YANO H., WANG B. E., AHMAD I., ZHANG J., ABO T., NAKAYAMA J., KREMPEN K., KOHWI Y. (1999). Identification of (CAG)_n and (CGG)_n repeat-binding proteins, CAGERS expressed in mature neurons of the mouse brain; *Exp. Cell Res.* 251(2): 388-400
- YANT S. R., ZHU W., MILLINOFF D., SLIGHTOM J. L., GOODMAN M., GUMUCIO D. L. (1995). High affinity YY1 binding motifs: identification of two core types (ACAT and CCAT) and distribution of potential binding sites within the human beta globin cluster; *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4353-4362
- YAO Y.-L., YANG W.-M., SETO E. (2001). Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation; *Mol. Cell Biol.* 21(17): 5979-5991
- YE J., CIPPITELLI M., DORMAN L., ORTALDO J. R., YOUNG H. A. (1996). The nuclear factor YY1 suppresses the human gamma interferon promoter through two mechanisms: inhibition of AP1 binding and activation of a silencer element; *Mol. Cell. Biol.* 16(9): 4744-4753
- ZAMBRANO N., DeRENZIS S., MINOPOLI G., FARAONIO R., DONINI V., SCALONI A., CIMINO F., RUSSO T. (1997). DNA-binding protein Pura α and transcription factor YY1

function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter; *Biochem. J.* 328(Pt 1): 293-300

ZHANG W., FARRES J., BUSCH H. (1991). Purification of a novel 55 kDa HeLa cell nuclear DNA-binding protein; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174(2): 542-548

ZINN K., DiMAIO D., MANIATIS T. (1983). Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene; *Cell* 34(3): 865-879

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Epigenetische Regulation an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Braunschweig unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Bode angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jürgen Bode für die Ermöglichung und Betreuung dieser Doktorarbeit. Seine stetige Bereitschaft zur Diskussion und sein unermüdlicher Einsatzwille auf vielerlei Ebenen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Koreferats, sowie Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Edward Seto und Prof. Dr. Robert Kelm möchte ich für die bereitwillige Aushändigung von Expressionsplasmiden und Antikörpern danken.

Großer Dank gilt auch Dr. Roland Wagner und Anja Kobold aus der ehemaligen Abteilung „Zellkulturtechnik“ für die Fermentation von eukaryontischen Zellen.

Ich möchte allen Kollegen des Bereichs MBIO – und natürlich darüber hinaus – für jegliche Art und Weise der Unterstützung danken, die mir während meiner Zeit an der GBF zuteil wurde.

Eine besondere Rolle nimmt dabei zweifelsohne das SAR-Labor ein. Ich danke Kristina Nehlsen, Silke Winkelmann, Sandra Götze, Astrid Hans, Eric Stellamanns, Yves Hüsemann, André Oumard und Melita Vidakovic für alle geistreichen und geistlosen Gespräche und die generell spaßige Atmosphäre, die uns tagtäglich das Laborleben erleichtert hat. Besonders hervorheben und danken möchte ich Karin Maaß und ihrem unverwechselbaren Naturell.

Meinem engsten Freundeskreis um Torsten Giesemann, Peter Willim, Patricia Winnicki, Andrea und Frank Jenzora, Familie Wenderoth und „der Dartrunde“ bin ich für jede Minute der Abwechslung äußerst dankbar.

Ein herzlicher Dank gilt natürlich auch meinen Eltern, die mich moralisch und finanziell während meiner gesamten Ausbildungszeit unterstützt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner besseren Hälfte Steffi danken, die stets an mich geglaubt und mich in schwierigen Zeiten aufgebaut hat. Vielen Dank für alles – ich bin froh, dass es Dich gibt.